

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**Evaluación de la actividad antimicrobiana,  
antioxidante y citotoxicidad de los extractos etanólico y  
acuoso de *Tagetes multiflora* kunth “chinche”**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

**AUTOR**

David Boris VELÁSQUEZ VILLAFUERTE

**ASESOR**

Teresa Celina GALLARDO JUGO  
Mónica Guadalupe RETUERTO FIGUEROA

Lima - Perú

2017

## **DEDICATORIA**

A **Dios**, por su inmenso amor y protección.

A mis padres **Nelson** y **Ana**, por su gran soporte y cariño, por todos sus denodados esfuerzos para que yo pueda ser un profesional. Todo lo que soy se lo debo a ustedes.

A mi hermanita **Karen**, porque a pesar que estás un poco lejos de mí, eres mi cómplice en todo. Eres la luz que me cuida e ilumina.

A mis hermanas **Jovanna** y **Elizabeth**, por sus palabras de aliento y por brindarme todo su apoyo incondicional.

A **Milagros**, por su gran cariño y comprensión, por su paciencia y ayudarme a crecer.

A mi hijito **Ismael**, por ser mi motivación y mi inspiración. Gracias por alegrar más mi vida.

**David B. Velásquez Villafuerte.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mí querida alma mater Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica por formarme y orientarme a ser un buen profesional.

A mi asesora de tesis, **Q.F. Teresa Celina Gallardo Jugo**, por su apoyo y dedicación para la culminación del presente trabajo.

A mi co-asesora, **Mg. Mónica Guadalupe Retuerto Figueroa** por su generosidad y valiosos conocimientos.

A la **Q.F. Bertha Jurado Teixeira**, por motivarme y guiarme en la realización del presente trabajo.

A la **Q.F. Eva Ramos Llica**, por sus aportes científicos y apoyo incondicional

A la **Mg. María Calixto Cotos** por su colaboración y sus aportes para el presente trabajo.

A **Jossimar Huamaní Tarazona** por su generosidad, empeño y apoyo en los momentos que más lo necesitaba.

A los docentes miembros del jurado: **Dra. Augusta Córdova Rivera**, **Mg. Cynthia Esquerre Huallpa**, **Dr. Pablo Bonilla Rivera** y **Mg. Luis Rojas Ríos**, muchas gracias por su amable apoyo.

# ÍNDICE

## RESUMEN

## SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN .....	17
1.1. Objetivo general .....	3
1.2. Objetivos específicos .....	3
1.3. Hipótesis .....	3
II. GENERALIDADES .....	4
2.1. Antecedentes .....	4
2.2. Marco teórico .....	9
2.2.1. Familia Asteraceae.....	9
2.2.2. Género <i>Tagetes</i> .....	11
2.2.3. <i>Tagetes multiflora</i> Kunth “chinche”.....	13
2.2.3.1. Taxonomía.....	13
2.2.3.2. Sinonimia Vulgar.....	13
2.2.3.3. Distribución geográfica.....	14
2.2.3.4. Descripción botánica.....	14
2.2.3.5. Composición fitoquímica.....	14
2.2.4. Actividad antimicrobiana.....	15
2.2.5. Actividad antioxidante.....	23

2.2.6. Actividad citotóxica.....	31
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	34
3.1. Tipo de estudio.....	34
3.2. Materiales, equipos y reactivos.....	34
3.3. Recolección del material vegetal.....	34
3.4. Estabilización de la muestra.....	37
3.5. Preparación de los extractos etanólico y acuoso.....	38
3.6. Marcha de solubilidad.....	39
3.7. Tamizaje fitoquímico.....	40
3.8. Cromatografía en capa fina.....	40
3.9. Evaluación de la actividad antimicrobiana: Método de difusión de pozo en agar.....	42
3.10. Evaluación de la actividad antioxidante: Método de captación del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo).....	45
3.11. Evaluación de la actividad citotóxica: Bioensayo de citotoxicidad en <i>Artemia salina</i> (CYTED).....	49
3.12. Esquema de los procedimientos experimentales .....	52
IV. RESULTADOS.....	53
4.1. Rendimiento del extracto etanólico y acuoso.....	53
4.2. Marcha de solubilidad.....	53
4.3. Tamizaje fitoquímico.....	54
4.4. Cromatografía en capa fina.....	56

4.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana: Método de difusión de pozo en agar.....	61
4.6. Evaluación de la actividad antioxidante: Método de captación del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo).....	67
4.7. Evaluación de la actividad citotóxica: Bioensayo de citotoxicidad en <i>Artemia salina</i> (CYTED).....	73
V. DISCUSIÓN.....	77
VI. CONCLUSIONES.....	83
VII. RECOMENDACIONES .....	84
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85
IX. ANEXOS .....	97

## **ABREVIATURAS**

**ATCC:** American Type Culture Collection.

**CLSI:** Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio.

**DPPH:** Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**RNS:** Especies reactivas de nitrógeno.

**SOD:** Superoxidasa dismutasa.

**CAT:** Catalasa.

**GPX:** Glutación peroxidasa.

**IC<sub>50</sub>:** Concentración máxima de la media inhibitoria.

**TEAC:** Capacidad antioxidante equivalente de Trolox.

**CL<sub>50</sub>:** Concentración letal media.

**CYTED:** Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.

**GL:** Grado de libertad.

**SC:** Suma de cuadrados.

**CM:** Cuadrado medio.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Tagetes multiflora</i> Kunth “chinche” .....	14
Figura 2. Método de difusión en disco de extracto microbiano utilizando <i>C. albicans</i> como microorganismo de ensayo.....	20
Figura 3. Método de difusión de pozos de agar de aceite esencial utilizando <i>Aspergillus niger</i> como microorganismo de ensayo.....	23
Figura 4. Ciclo vital de <i>Artemia salina</i> .....	32
Figura 5. Etapas de desarrollo de <i>Artemia salina</i> .....	32
Figura 6. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.....	46
Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología.....	52
Figura 8. Cromatograma con estándar ácido tánico y revelador FeCl <sub>3</sub> 10%. AT: Ácido tánico, EE: extracto etanólico y EA: Extracto acuoso.....	56
Figura 9. Cromatograma con estándar ácido gálico y revelador FeCl <sub>3</sub> 10%. AG: Ácido gálico, EE: extracto etanólico y EA: Extracto acuoso.....	56
Figura 10. Cromatograma con estándar de rutina. R: Rutina, EE: Extracto etanólico, EA: Extracto acuoso.....	57
Figura 11. Cromatograma con estándar de rutina y revelador AlCl <sub>3</sub> 10 % en luz UV.....	57
Figura 12. Cromatograma con estándar rutina y con revelador FeCl <sub>3</sub> 10%.....	57
Figura 13. Cromatograma con estándar de quercetina. Q: Quercetina, EE: Extracto etanólico, EA: Extracto acuoso.....	58



Figura 14. Cromatograma con estándar de quercetina y revelador $\text{AlCl}_3$ 10% en luz UV. Q: Quercetina, EE: Extracto etanólico, EA: Extracto acuoso.....	58
Figura 15. Cromatograma con estándar quercetina y con revelador $\text{FeCl}_3$ 10%.....	58
Figura 16. Cromatograma de raíz de <i>Polygala virginiana</i> como estándar. RP: Raíz polígala, EE: Extracto etanólico, EA: Extracto acuoso.....	59
Figura 17. Cromatograma de los extractos etanólico, acuoso y raíz <i>Polygala virginiana</i> como estándar y con revelador vainillina más $\text{H}_2\text{SO}_4$ 10% después de ser calentado en cocinilla.....	59
Figura 18. Cromatograma de raíz de <i>Smilax officinalis</i> “zarzaparrilla” como estándar. Z: Zarzaparrilla, EE: Extracto etanólico, EA: Extracto acuoso.....	60
Figura 19. Cromatograma de los extractos etanólico, acuoso y raíz de <i>Smilax officinalis</i> “zarzaparrilla” como estándar y con revelador vainillina más $\text{H}_2\text{SO}_4$ 10% después de ser calentado en cocinilla.....	60
Figura 20. Halo de inhibición de los extractos etanólico y acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	63
Figura 21. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico (derecha) y acuoso (izquierda) al 20 % de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth en <i>Escherichia coli</i> con estándar gentamicina.....	63
Figura 22. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico (derecha) y acuoso (izquierda) al 20 % de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con estándar gentamicina.....	64
Figura 23. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico (derecha) y acuoso (izquierda) al 20 % de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth en <i>Staphylococcus aureus</i> con estándar gentamicina.....	64

Figura 24. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico (derecha) y acuoso (izquierda) al 20 % de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth en <i>Bacillus subtilis</i> con estándar gentamicina.....	64
Figura 25. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico (derecha) y acuoso (izquierda) al 20 % de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth en <i>Aspergillus niger</i> con estándar fluconazol.....	65
Figura 26. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico (derecha) y acuoso (izquierda) al 20 % de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth en <i>Candida albicans</i> con estándar fluconazol.....	65
Figura 27. Porcentaje de inhibición del extracto etanólico seco de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth por el método del DPPH.....	68
Figura 28. Absorbancia vs Concentración del extracto etanólico de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	68
Figura 29. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso seco de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth por el método del DPPH.....	70
Figura 30. Absorbancia vs Concentración del extracto acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	70
Figura 31. Porcentaje de Inhibición del Trolox por el método del DPPH.....	71
Figura 32. Capacidad antioxidante de Trolox por el método de DPPH.....	71
Figura 33. Gráfico comparativo de <i>Artemia salina</i> muertas en el extracto etanólico de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth a las 24 horas.....	73
Figura 34. Gráfico comparativo de <i>Artemia salina</i> muertas en el extracto acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth a las 24 horas.....	75
Figura 35. Muestra de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	98

Figura 36. Muestra vegetal secada en estufa.....	98
Figura 37. Muestra vegetal molida.....	98
Figura 38. Filtrado del extracto etanólico de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	98
Figura 39. Extracto etanólico seco de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	98
Figura 40. Ensayo de solubilidad del extracto etanólico de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	99
Figura 41. Ensayo de solubilidad del extracto acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	99
Figura 42. Ensayo de Molish.....	99
Figura 43. Ensayo de antrona.....	99
Figura 44. Ensayo de FeCl <sub>3</sub> .....	99
Figura 45. Ensayo de Gelatina.....	99
Figura 46. Ensayo de Ninhidrina.....	100
Figura 47. Ensayo de Shinoda.....	100
Figura 48. Ensayo de Lieberman – Burchardat.....	100
Figura 49. Ensayo de Mayer.....	100
Figura 50. Ensayo de Dragendorff.....	100
Figura 51. Ensayo de Rosenheim.....	100
Figura 52. Ensayo de Hidroxilamina.....	101
Figura 53. Ensayo de Vainillina.....	101
Figura 54. Ensayo de Borntrager.....	101
Figura 55. Ensayo de Fehling.....	101
Figura 56. Ensayo de Benedict.....	101
Figura 57. Ensayo de saponina.....	101

Figura 58. Preparación de diluciones de los extractos etanólico y acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	102
Figura 59. Diluciones del extracto etanólico con solución de DPPH.....	102
Figura 60. Diluciones del extracto acuoso con solución de DPPH.....	102
Figura 61. Lectura de las muestras y blancos en el espectrofotómetro a 517 nm.....	102
Figura 62. Preparación de la solución madre (2000 ppm) a partir de los extractos secos de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	105
Figura 63. Preparación del agua de mar.....	105
Figura 64. Incubación de los huevos de <i>Artemia salina</i> con luz artificial y con bomba de oxígeno con burbujeo lento.....	105
Figura 65. Concentraciones de extracto acuoso y controles por triplicado.....	105
Figura 66. Concentraciones de extracto etanólico y controles por triplicado.....	105

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	13
Tabla 2. Principales compuestos antimicrobianos presentes en plantas.....	18
Tabla 3. Medios de cultivo, tamaño del inóculo microbiano y condiciones de incubación para los métodos de prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, según lo recomendado por CLSI.....	20
Tabla 4. Clasificación de los antioxidantes.....	27
Tabla 5. Ensayos para la medición de la actividad antioxidante.....	29
Tabla 6. Escala de Duraffourd para determinar el efecto inhibitorio según el diámetro de inhibición.....	45
Tabla 7. Clasificación de Toxicidad según CYTED.....	51
Tabla 8. Rendimiento de los extractos etanólico y acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	53
Tabla 9. Ensayo de solubilidad del extracto etanólico de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	53
Tabla 10. Ensayo de solubilidad del extracto acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	54
Tabla 11. Tamizaje fitoquímico de los extractos etanólico y acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	55
Tabla 12. Promedio de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano (nm).....	62
Tabla 13. Análisis estadístico entre e intramuestra a través de la prueba de ANOVA entre los resultados del extracto etanólico.....	66

Tabla 14. Análisis estadístico entre e intramuestra a través de la prueba de ANOVA entre los resultados del extracto etanólico para la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> y el blanco etanol.....	66
Tabla 15. Resultados de la actividad antioxidante del extracto etanólico seco de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth por el método de DPPH.....	67
Tabla 16. Resultados de la actividad antioxidante del extracto acuoso seco de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth por el método de DPPH.....	69
Tabla 17. Capacidad antioxidante del extracto etanólico y acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth expresados en términos de IC <sub>50</sub> y TEAC.....	72
Tabla 18. Recuento de <i>Artemias salinas</i> en extracto etanólico de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth a las 24 horas.....	72
Tabla 19. Resultados del bioensayo de citotoxicidad del extracto etanólico de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth procesados en el modelo Provit del SPSS 22.....	74
Tabla 20. Recuento de <i>Artemias salinas</i> en extracto acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth a las 24 horas.....	74
Tabla 21. Resultados del bioensayo de citotoxicidad del extracto acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth procesados en modelo Provit del SPSS 22.....	76
Tabla 22. Análisis estadístico ANOVA de los resultados de la actividad antioxidante del extracto etanólico de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	102

Tabla 23. Análisis estadístico de los resultados de la actividad antioxidante del extracto etanólico de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth por el método de Tukey con un nivel de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ).....	103
Tabla 24. Análisis estadístico ANOVA de los resultados de la actividad antioxidante del extracto acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	103
Tabla 25. Análisis estadístico de los resultados de la actividad antioxidante del extracto acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth por el método de Tukey con un nivel de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ).....	104
Tabla 26. Límites de confianza para el extracto etanólico de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	106
Tabla 27. Límites de confianza para el extracto acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.....	108

## RESUMEN

*Tagetes multiflora* Kunth, es una especie vegetal que crece generalmente en zonas andinas y es conocida como “chinche”. Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar las actividades antimicrobiana, antioxidante y citotoxicidad de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión de pozo en agar frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 14053 y *Aspergillus niger* ATCC 16404. La actividad antioxidante se evaluó por el método de DPPH y la actividad citotóxica se evaluó mediante el bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina* (CYTED). En el extracto etanólico presentó formación de halos frente a las cepas *Escherichia coli* (11,33 mm  $\pm$  0,58), *Pseudomonas aeruginosa* (13 mm  $\pm$  1,0) y *Staphylococcus aureus* (15,67 mm  $\pm$  1,15); y el extracto acuoso frente a la cepa *Aspergillus niger* (13,67 mm  $\pm$  0,58). El extracto etanólico presentó un IC<sub>50</sub> de 60,93  $\mu$ g/mL  $\pm$  0,40; y el extracto acuoso 40,42  $\mu$ g/mL  $\pm$  0,24. El extracto etanólico presentó un CL<sub>50</sub> de 35,568  $\mu$ g/mL y el extracto acuoso 386,048  $\mu$ g/mL. El extracto etanólico presentó actividad antimicrobiana (frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*), actividad antioxidante y alta actividad citotóxica; mientras que el extracto acuoso presentó actividad antimicrobiana (frente a *Aspergillus niger*), actividad antioxidante y moderada actividad citotóxica.

**Palabras clave:** *Tagetes multiflora* Kunth “chinche”, antimicrobiana, antioxidante, citotoxicidad, extracto, etanólico, acuoso.



## SUMMARY

*Tagetes multiflora* Kunth, is a plant species that generally grows in Andean zones and is known as "bedbug". The objectives of this study were to evaluate the antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity activities of ethanolic and aqueous extracts of *Tagetes multiflora* Kunth. The antimicrobial activity was evaluated by the method of diffusion in agar against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 14053 and *Aspergillus niger* ATCC 16404. The antioxidant activity assessed by the DPPH method and cytotoxic activity was evaluated by cytotoxicity bioassay in *Artemia salina* (CYTED). In the ethanolic extract introduced halos against strains *Escherichia coli* (11,33 mm + 0,58), *Pseudomonas aeruginosa* (13 mm + 1,0) and *Staphylococcus aureus* (15,67 mm + 1,15); And the aqueous extract against the strain *Aspergillus niger* (13,67 mm + 0,58). The ethanolic extract had an IC<sub>50</sub> of 60,93 µg / mL + 0,40; And aqueous extract 40,42 µg / mL + 0,24. The ethanolic extract presented a LC<sub>50</sub> of 35,568 µg / mL and the aqueous extract 386,048 µg / mL. The ethanolic extract showed antimicrobial activity (against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*), antioxidant activity and high cytotoxic activity; while the aqueous extract showed antimicrobial activity (against *Aspergillus niger*), antioxidant activity and moderate cytotoxic activity.

**Key words:** *Tagetes multiflora* Kunth "chinche", antimicrobial, antioxidant, cytotoxicity, extract, ethanolic, aqueous.

## I. INTRODUCCIÓN

El Perú es un país privilegiado por poseer una gran diversidad de flora y gracias al gran legado cultural de nuestros pueblos, muchas de estas especies vegetales son utilizadas como recursos medicinales naturales para el tratamiento de enfermedades. Una de ellas es *Tagetes multiflora* Kunth, especie vegetal de la Familia Asteraceae del género *Tagetes* que proviene de diversas zonas del Perú (Ancash, Arequipa, Cusco, Junín y Lima) pero que también crecen en otros países como Argentina, Bolivia, Ecuador y Chile <sup>1, 2, 3</sup>.

El género *Tagetes* (Asteraceae) es originario de Sudamérica, pero actualmente posee una distribución cosmopolita y representa uno de los grupos más ricos en formas de angiospermas. *Tagetes* spp es de importancia económica e incluye especies de plantas comestibles y ornamentales. Además, los extractos de este género se caracterizan por sus actividades farmacéuticas, insecticidas y nematocidas, siendo *T. minuta*, *T. erecta*, *T. patula* y *T. terniflora* las especies mejores conocidas <sup>4</sup>.

Existen evidencias científicas donde demuestran que algunas especies de *Tagetes* presentan actividad antioxidante tal como es el caso de *Tagetes erecta* L, que en diversos extractos, determinaron los siguientes compuestos antioxidantes: ácido gálico, gallicina, quercetagetina, 6-hidroxi-kaempferol-o-hexosido, patuletina-o-hexosido y quercetina. A su vez, extractos de *Tagetes*

*filifolia* Lag, *Tagetes erecta* L y *Tagetes lúcida* Cav mostraron niveles de toxicidad elevados en *Artemia salina*. También, algunas publicaciones confieren a la especie *Tagetes* propiedades antimicrobianas frente a diversas cepas <sup>5, 6, 7,8</sup>.

*Tagetes multiflora* Kunth es una especie vegetal silvestre que no ha sido muy estudiado pero que según referencias orales de los pobladores y de especies del mismo género, presenta actividades antimicrobianas que pueden tener aplicación en el desarrollo de nuevos fármacos ante microorganismos que cada vez son más resistentes. También con la presencia de actividad antioxidante podría ser utilizado como una fuente efectiva de antioxidante natural y aditivo antibacteriano para proteger los alimentos de los daños oxidativos y agentes patógenos transmitidos por los alimentos e incluso podría tener impacto en la industria cosmética.

Muchos de los fármacos con los que se cuenta en la actualidad presentan efectos adversos muy severos durante el tratamiento quimioterápico, es de gran importancia encontrar y proponer nuevas moléculas como alternativa a la terapia antitumoral. Por ello, la evaluación de la citotoxicidad de los extractos de *Tagetes multiflora* Kunth abriría camino para el diseño de nuevos fármacos anticancerígenos.

### 1.1. Objetivo general

- Evaluar la actividad antimicrobiana, antioxidante y citotóxica de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth “chinche”.

### 1.2. Objetivos específicos

- Obtener los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth “Chinche”
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth “chinche” por el método de difusión de pozos en agar.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth “chinche” por el método de DPPH.
- Evaluar la citotoxicidad de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth “chinche” mediante el bioensayo en *Artemia salina*.

### 1.3. Hipótesis

Los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth “chinche” tienen actividad antimicrobiana, antioxidante y citotóxica.

## II. GENERALIDADES

### 2.1. Antecedentes

*Tagetes multiflora* Kunth conocida como “chinche”, es una especie vegetal que crece generalmente en zonas andinas. Su uso popular es como alimento y condimento además presenta un aroma característico debido a la presencia de su aceite esencial <sup>1, 3, 9</sup>.

Carrasco, demostró que el aceite esencial de *Tagetes multiflora* Kunth es considerado como una sustancia moderadamente tóxica debido a que su DL<sub>50</sub> resultó ser 1763,73 mg/Kg. Además, la actividad frente a *Candida albicans* del aceite volátil y de sus fracciones es menor a la actividad con respecto a la nistatina empleado como estándar <sup>10</sup>.

Segovia y Suárez, evaluaron la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Tagetes elliptica* Sm. y los resultados mostraron actividad significativa frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* (halo de inhibición de  $65 \pm 5,56$  mm al 100 %), *Staphylococcus epidermidis* (halo de inhibición de 56 mm al 100 %), *Bacillus subtilis* (halo de inhibición de  $33,67 + 0,58$  mm al 100 %), *Escherichia coli* (halo de inhibición de  $25 + 1,41$  mm al 100 %), *Pseudomonas aeruginosa* (halo de inhibición de  $32 + 6,93$  mm al 100 %). Asimismo presentó actividad antifúngica significativa frente a *Cándida albicans* (halo de inhibición de  $47,5 + 0,71$  mm al 100 %). Además, se evaluó la actividad antioxidante por el método de captación del radical libre difenilpicrilhidrazilo

(DPPH) lo cual no presentó actividad significativa frente a las sustancias de referencia Trolox y Vitamina C <sup>11</sup>.

Rea, a través de su estudio de la actividad antimicrobiana por el método de Mitscher, comprobó que el extracto etanólico de *Tagetes filifolia* Lag presentó actividad parcial frente a *Candida albicans* ATCC 10231 a concentración de 10.000 µg/mL. El subextracto etéreo a una concentración de 10.000 µg/mL es activo sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231. El subextracto clorofórmico presentó actividad parcial frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231 a una concentración de 10.000 µg/mL <sup>8</sup>.

Gong et al., evaluaron la actividad antioxidante de los extractos de *Tagetes erecta* L utilizando los métodos de DPPH, ABTS y FRAP. Los resultados del análisis mostraron que la actividad antioxidante fue bien correlacionada con el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales ( $R^2 > 0.900$ ). Además los compuestos antioxidantes identificados fueron ácido gálico, gallicina, quercetagina, 6-hidroxikaempferol-o-hexosido, patuletina-o-hexosido y quercetina <sup>5</sup>.

Karimian et al., examinaron la capacidad antioxidante del aceite esencial de *Tagetes minuta* mediante la medición de oxígeno reactivo, especies reactivas de nitrógeno y de eliminación de peróxido de hidrógeno. El aceite esencial de *Tagetes minuta* tuvo la capacidad de eliminar todas las especies reactivas de

oxígeno/nitrógeno con IC<sub>50</sub> 12-50 µg/mL, lo que concluyeron que posee una potente actividad de eliminación de radicales <sup>12</sup>.

Díaz, determinó la actividad antibacteriana en los extractos acuoso y etanólico de *Tagetes elliptica* Sm. “chincho” por el método de difusión en agar. Se demostró que en el extracto acuoso es inactivo a las concentraciones de 100, 50 y 25 mg/mL; y el extracto etanólico presentó actividad antibacteriana a la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25933 con 16, 15 y 14,5 mm a la concentración de 100, 50 y 25 mg/mL respectivamente; asimismo, mostró actividad antibacteriana frente a la bacteria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 con 14, 13,5 y 15 mm a la concentración de 100, 50 y 25 mg/mL respectivamente. No tuvo ninguna actividad significativa contra *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*<sup>13</sup>.

Bussmann et al., evaluaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las propiedades antibacterianas en los extractos etanólico y acuoso de 141 plantas medicinales usados en el norte del Perú. En este estudio se incluyeron a las especies *Tagetes erecta* L. y *Tagetes filifolia* Lag y se usó el método de microdilución en caldo de pozo profundo. En el caso de *Tagetes erecta* L, las concentraciones mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico fueron 16 mg/mL para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; en cambio, la CMI del extracto acuoso fue 64 mg/mL para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. A su vez, las concentraciones mínimas inhibitorias del extracto etanólico de *Tagetes filifolia* Lag fueron 16 mg/mL para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* <sup>14</sup>.

Taheri et al., demostraron la actividad citotóxica *in vitro* del aceite esencial de *Tagetes minuta* en líneas celulares de cáncer nasofaríngeo y carcinoma hepatocelular cuyas concentraciones inhibitorias (IC<sub>50</sub>) resultaron 75 $\pm$  5 y 70 $\pm$  4  $\mu$ g/mL respectivamente. También se examinó la actividad antioxidante del aceite cuyas concentraciones inhibitorias (IC<sub>50</sub>) para las especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) de barrido fueron 12 y 17  $\mu$ g/mL respectivamente. A su vez, en la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite, la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* fueron 150 $\pm$  8, 165 $\pm$  9, 67 $\pm$  8, 75 $\pm$  7, 135 $\pm$  15, y 115 $\pm$  8  $\mu$ g / mL respectivamente <sup>15</sup>.

Bussmann et al., realizaron un estudio sobre la toxicidad en *Artemia salina* de las plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional en el norte del Perú que incluyó a *Tagetes filifolia* Lag y *Tagetes erecta* L. La concentración letal (CL<sub>50</sub>) de los extractos acuoso y etanólico de *Tagetes filifolia* Lag fueron 961  $\mu$ g/mL y >10000  $\mu$ g/mL, mientras que los extractos acuoso y etanólico de *Tagetes erecta* L. fueron >10000  $\mu$ g/mL y 12  $\mu$ g/mL respectivamente <sup>6</sup>.

Mejía et al., determinaron la actividad citotóxica de *Tagetes lucida* Cav., a través de 17 extractos de diferentes órganos de la planta que se obtuvieron por maceración en frío (metanol: cloroformo), maceración sucesiva (hexano, diclorometano y metanol), infusión y extracción en Soxhlet (acetato de etilo). La mayor parte de los extractos fueron citotóxicos para el crustáceo *Artemia salina*



siendo el extracto hexánico el más citotóxico. Se purificaron el 7-metoxicumarina y 6,7-dimetoxicumarina de las hojas de extracto hexánico y ambos compuestos causaron citotoxicidad en *Artemia salina*, con valores de CL<sub>50</sub> de 28 y 238 µg / mL, respectivamente. Concluyeron que el efecto citotóxico observado en *T. lucida* se debe a las cumarinas <sup>7</sup>.

## **2.2. Marco teórico**

### **2.2.1. Familia Asteraceae**

Asteraceae, término proveniente del latín “aster” que significa “estrella”, describe a las diferentes formas de inflorescencias. La mayor parte de las asteraceae tienen cualidades entomófilas aportando con néctar y polen a los insectos.

La familia Asteraceae está comprendida aproximadamente de 23500 a 32000 especies, con un total de 1600 géneros, clasificadas en 5 subfamilias, 19 tribus y forman parte de la familia de las angiospermas <sup>16</sup>.

#### **➤ Origen y distribución geográfica.**

La familia Asteraceae está distribuida por todo el mundo, especialmente en zonas semiáridas, tropicales y subtropicales <sup>16</sup>.

#### **➤ Descripción botánica**

Las plantas que integran esta familia son un grupo altamente heterogéneo respecto a la morfología de sus partes vegetativas (raíces, tallos, hojas, indumento, etc.), ya que presentan casi todos los tipos de formas, disposición y arreglo; en cambio, es conspicuamente homogéneo en cuanto a la morfología de la inflorescencia que las hace verdaderamente inconfundibles, y se presenta como una cabezuela o capítulo (estructura altamente especializada, con funciones de atracción de los vectores de polinización que generalmente que aparenta ser una sola flor si se le mira superficialmente,

pero vista en detalle, resulta estar compuesta de decenas o incluso centenares de flores diminutas insertadas en una base carnosa (receptáculo)<sup>17</sup>.

A su vez, dentro de la familia Asteraceae, se encuentran plantas leñosas o herbáceas que pueden alcanzar los 60 cm hasta los 2 metros de altura y sus raíces presentan una profundidad de 30 cm. Sus hojas son simples contrapuestas y alternadas bipinnadas de forma dentada o lobada. Respecto a las flores, son de tamaño pequeño regulares o irregulares, presenta capítulos homógamos y heterógamos con inflorescencias, sus sépalos tienen forma de pelos, su androceo presenta 5 estambres formado por un tubo por el cual circula el estilo con filamentos libres. Su gineceo exhibe dos carpelos que forma un ovario que finaliza en su estigma hondamente bífido<sup>16</sup>.

➤ **Composición química de la familia Asteraceae**

Las Asteraceae se caracterizan por la presencia de ácidos iso- y clorogénico, isoflavonoides, lactonas sesquiterpénicas, alcoholes triterpénicos pentacíclicos, aceites esenciales (con predominio de terpenoides), alcaloides (especialmente pirrolizidínicos) y diversos derivados acetilénicos, mientras que carece de taninos verdaderos y de iridoides. La síntesis de glúcidos en último término conduce a la formación de fructanos del tipo inulina acumulados en órganos subterráneos y semillas; son la principal reserva hidrocarbonada, de gran digestibilidad y reemplazan el almidón. La síntesis de ciclitales también caracteriza a las Asteráceas, especialmente L-inositol y su isómero esciloinositol.

Los metabolitos secundarios aislados de Asteráceas son muy variados. Algunos flavonoides y aceites volátiles (con di- y triterpenos) son comunes a casi todas las especies y 2 grupos de sustancias son “marcadores quimiotaxonómicos” de la Familia: las lactonas sesquiterpénicas y los compuestos poliacetilénicos. En general estas plantas carecen de alcaloides, salvo los de núcleo pirrolizidínico. Finalmente, es llamativa la ausencia de iridoides, aminoácidos no proteicos y taninos verdaderos <sup>18</sup>.

### 2.2.2. Género *Tagetes*

El género *Tagetes* pertenece a la familia Asteraceae (Tribu *Tageteae*) y comprende aproximadamente entre 40 y 50 especies de las cuales cerca de la mitad habita en México. Las especies del género se caracterizan por poseer flores cuyos colores varían desde el amarillo claro al anaranjado intenso, esto debido a la acumulación de carotenoides en los cromoplastos de sus inflorescencias. Muchas plantas de esta especie son utilizadas con fines ornamentales <sup>19</sup>.

#### ➤ ***Tagetes* spp**

Los *Tagetes* spp son nativos del Perú, Ecuador, México, Nicaragua, Panamá en general gran parte de América y se desarrollan en espacios descubiertos preferentemente en climas cálidos. Además, crecen en cualquier tipo de suelo y sobre todo si presentan buen drenaje. Son plantas herbáceas o perennes <sup>16</sup>,

<sup>20</sup>.

➤ **Descripción botánica**

Los *Tagetes* sp pueden medir desde los 90 cm hasta los 2 metros de altura. Presenta inflorescencias en cimbras o los capítulos pequeños, medianos o grandes y solitarios. Involucro cilíndrico o acampanado, formado por una sola serie de filarias soldadas por sus bordes casi totalmente. Presencia de flores amarillas, naranjas, oro, blanco y en ocasiones con reflejo brillante, dimorfas o raro isomorfas por ausencia de las marginales: las marginales uniseriadas, femeninas con corola liguladas entera, bilobada o tridentada en el ápice; las del disco hermafroditas, con corola tubulosa, pentadentada. Además, presentan hojas piñadas de color verde <sup>16, 21</sup>.

➤ **Componentes fitoquímicos**

Muchos estudios en diferentes especies de *Tagetes* demuestran la presencia de flavonoides y terpenos que les proporciona propiedades farmacológicas, insecticidas y larvicidas <sup>19, 22, 23</sup>.

➤ **Usos y propiedades**

En el área culinaria, se utiliza para “aromatizar” las comidas, quesos y como aliño. Como infusión se usa para aliviar la diarrea en el bebé, dolor de estómago, hinchazón y el zumo se aplica para la curación de las hemorroides <sup>9, 10</sup>.

### 2.2.3. *Tagetes multiflora* Kunth “chinche”

#### 2.2.3.1. Taxonomía

La especie *Tagetes multiflora* Kunth se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Tagetes multiflora* Kunth<sup>10</sup>

<b>DIVISIÓN</b>	Magnoliophyta
<b>CLASE</b>	Magnoliopsida
<b>ORDEN</b>	Asterales
<b>FAMILIA</b>	Asteraceae
<b>SUBFAMILIA</b>	Asteroideae
<b>TRIBU</b>	Tageteae
<b>GÉNERO</b>	Tagetes
<b>ESPECIE</b>	<i>Tagetes multiflora</i> Kunth
<b>NOMBRE VULGAR</b>	“chinche”

**Fuente:** Museo de Historia Natural. Universidad Nacional Mayor de San Marcos

#### 2.2.3.2. Sinonimia vulgar

La especie *Tagetes multiflora* Kunth es conocido con los siguientes nombres: “chinche”, “chincho”, “chínchog”, “suyko”, “sayko”, “té de burro”<sup>10</sup>.

#### **2.2.3.3. Distribución geográfica:**

En Perú (Ancash, Arequipa, Cusco, Junín, Lima), Argentina (Catamarca, Jujuy, La Riola, Salta, Tucumán), Bolivia, Ecuador, Chile <sup>10</sup>.

#### **2.2.3.4. Descripción botánica**

Hierba anual de 30-80 cm de alto, tallo cilíndrico, hojas opuestas en la base, alternas las que están cerca de la inflorescencia; limbo imparipennado, foliolos lineal-lanceolados, margen dentado aserrado. Capítulos en cimas corimbosas, heterógamo. Flores del disco hermafrodita, corola tubulosa pentadentada <sup>24</sup>.



**Figura 1.** *Tagetes multiflora* Kunth

#### **2.2.3.5. Composición fitoquímica**

En un estudio en los aceites esenciales de *Tagetes multiflora* Kunth, por medio de cromatografía gaseosa acoplada a detector de masa (CG/EM), se identificó los siguientes componentes: (Z)- $\beta$ -Ocimeno (29,25%), (E)- $\beta$ -Ocimeno

(23,45%), Limoneno (12%), (E)-Ocimenona (11,85%), (Z)-Ocimenona (5,28%),  $\alpha$ -Fellandreno (4,96%),  $\alpha$ -Terpineno (2,92%), (Z)-Tagetona (1,75%) al 86% <sup>10</sup>.

Además, en otro estudio realizado también en los aceites esenciales de *Tagetes multiflora* Kunth se reportó como componentes mayoritarios: (Z) Tagetona (47%), (E)-Ocimenona (17%), (Z)- $\beta$ -Ocimeno (13%), y Dihidrotagetona (8%) <sup>25</sup>.

En un estudio de los extractos etanólicos de *Tagetes multiflora* se logró extraer flavonoides mediante maceración y concentración evidenciándose la presencia de bioflavonoides con el ensayo positivo de shinoda y del cloruro férrico <sup>16</sup>.

Sin embargo, la composición química de las diversas especies vegetales, no son uniformes ya que dependen de factores intrínsecos (edad, identidad de las variedades, estado de las hojas) y extrínsecos (zonas geográficas, forma de cultivo y el medio ambiente) <sup>11</sup>.

#### **2.2.4. Actividad antimicrobiana**

Las plantas presentan una gran variedad de metabolitos secundarios, como por ejemplo taninos, alcaloides, terpenoides, y flavonoides, que presentan propiedades antimicrobianas *in vitro* (Tabla 2). Los fenoles simples y ácidos fenólicos son los bioactivos más simples, sus estructuras consisten en un solo anillo fenólico sustituido. El ácido cinámico y cafeico son representantes



comunes de un amplio grupo de compuestos de derivados de fenilpropano que presentan el estado de oxidación más alto, las hierbas comunes como el estragón y el tomillo contienen ácido cafeico, que es eficaz contra los virus, bacterias y hongos. Catecol y pirogalol ambos son fenoles hidroxilados, que han demostrado ser tóxicos para los microorganismos, el primero presenta dos grupos -OH y el segundo tiene tres <sup>58</sup>.

Los mecanismos responsables de la toxicidad fenólica a microorganismos, incluyen la inhibición de la enzima betaglucano-sintasa por los compuestos oxidados, posiblemente a través de la reacción con grupos sulfhidrilo o a través de interacciones no específicas con proteínas. Los aceites esenciales son a menudo citados como antimicrobianos, un ejemplo es el eugenol, representante característico que se encuentra en el aceite de clavo. Este es considerado como un bacteriostático contra los hongos y las bacterias <sup>53, 54, 58</sup>.

Los flavonoides también son sustancias fenólicas hidroxiladas unidas a un anillo aromático y como es sabido en muchos estudios, estos compuestos pueden ser sintetizados por las plantas en respuesta a la infección microbiana. Su actividad es probablemente debido a su capacidad para formar complejos con las proteínas extracelulares y solubles, además de formar complejos con las paredes celulares bacterianas, más flavonoides lipófilos también pueden romper las membranas microbianas <sup>55, 58</sup>.

Las catequinas, son flavonoides que han sido ampliamente investigados debido a su ocurrencia en el té verde donde se observó que ejercieron actividad antimicrobiana; estos compuestos inhibieron *in vitro* al *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella* y otras bacterias, además inactivan la toxina del cólera y las glucosiltransferasas bacterianas en el *Streptococcus mutans*. La delineación del posible mecanismo de acción de flavonas y flavonoides se ve obstaculizada por resultados contradictorios. Como se sabe, los flavonoides que carecen de grupos hidroxilos en sus  $\beta$ -anillos son más activos contra los microorganismos que los que tienen los grupos  $-\text{OH}$ , este hallazgo apoya la idea de que su objetivo es la membrana microbiana. Los compuestos lipofílicos serían más perjudiciales de esta estructura. Sin embargo, varios autores han encontrado también el efecto contrario; es decir, a mayor hidroxilación, mayor es la actividad antimicrobiana <sup>56, 58</sup>.

**Tabla 2.** Principales compuestos antimicrobianos presentes en plantas<sup>55, 58</sup>

Clase	Subclase	Ejemplo(s)	Mecanismo
<b>Fenólicos</b>	Fenoles	Catecol	Privación del sustrato
	Simple	Epicatequina	Destrucción de la membrana
	Ácidos	Ácido cinámico	
	Fenólicos		
	Quinonas	Hipericina	Enlazar adhesinas formando complejos con la pared, inactiva enzimas
	Flavonoides	Crisina	Enlazar adhesinas
	Flavonas	Abyssinone	Formar complejos con la pared celular
			Inactiva enzimas
			Inhibir la transcriptasa inversa del VIH
	Flavonoles	Totarol	
	Taninos	Elagitanino	Une a las proteínas
			Enlazar adhesinas
			Inhibición de enzimas
			Privación del sustrato
			Formar complejos con la pared celular
			Destrucción de la membrana
			Formar complejos con el ión metálico
	Cumarinas	Warfarina	Interacción con el ADN eucariota (actividad antiviral)
<b>Terpenos, aceites esenciales</b>		Capsaicina	Destrucción de la membrana
<b>Alcaloides</b>		Berberina	Intercalarse en la pared
		Piperina	celular y/o ADN
<b>Lectinas y polipéptidos</b>		Manosa específica-Aglutina	Bloquea la fusión viral o adsorción
		Fabatin	Forma puentes disulfuros
<b>Poliacetilenos</b>		8S-Heptadeca-2(Z),9(Z)-dieno-4,6-diino-1,8-diol	

➤ **Método de difusión de disco en agar**

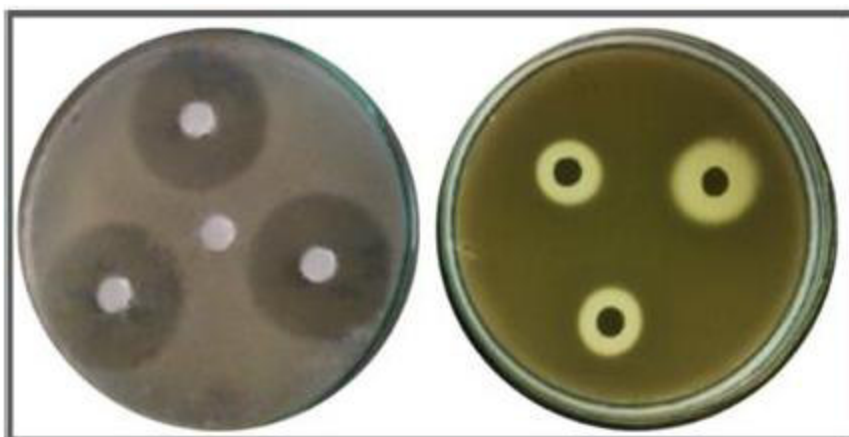
La prueba de difusión de disco en agar desarrollada en 1940 es el método oficial utilizado en muchos laboratorios de microbiología clínica para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de rutina. Hoy en día, muchos estándares aceptados y aprobados son publicados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) para pruebas de bacterias y levaduras. Aunque no todas las bacterias pueden ser probadas con precisión por este método, se ha realizado la estandarización para probar ciertos patógenos bacterianos exigentes como *estreptococos*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*, utilizando medios de cultivo específicos, diversas condiciones de incubación y criterios interpretativos para zonas de inhibición<sup>26</sup>.

En este procedimiento las placas de agar se inoculan con un inóculo normalizado del microorganismo de ensayo. A continuación, se colocan en la superficie de agar discos de papel de filtro (aproximadamente 6 mm de diámetro) que contienen el compuesto de ensayo a una concentración deseada

<sup>26</sup>.

Las placas de Petri se incuban en condiciones adecuadas. Generalmente, el agente antimicrobiano se difunde en el agar e inhibe la germinación y el crecimiento del microorganismo de ensayo y luego se miden los diámetros de las zonas de crecimiento de inhibición (Figura 2). La Tabla 3 muestra el medio

de crecimiento, la temperatura, el período de incubación y el tamaño del inóculo requerido por los estándares CLSI.



**Figura 2.** Método de difusión en disco de extracto microbiano utilizando *C. albicans* como microorganismo de ensayo<sup>33</sup>

**Tabla 3.** Medios de cultivo, tamaño del inóculo microbiano y condiciones de incubación para los métodos de prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, según lo recomendado por CLSI<sup>27</sup>

Culture media, microbial inoculum size and incubation conditions for antimicrobial susceptibility testing methods as recommended by CLSI.						
Methods	Microorganism	Growth medium	Final inoculum size	Incubation temperature (°C)	Incubation time (h)	Ref.
Disk-diffusion method	Bacteria	MHA	(0.5 McFarland) (1–2) × 10 <sup>8</sup> CFU/mL	35 ± 2	16–18	M02-A [9]
	Yeast	MHA + GMB <sup>a</sup>	(0.5 McFarland) (1–5) × 10 <sup>6</sup> CFU/mL	35 ± 2	20–24	M44-A [10]
Broth microdilution	Molds	Non-supplemented MHA	(0.4–5) × 10 <sup>6</sup> CFU/mL	–	–	M51-A [18]
	Bacteria	MHB	5 × 10 <sup>5</sup> × CFU/mL	35 ± 2	20	M07-A [56]
	Yeast	RPMI 1640 <sup>b</sup>	(0.5–2.5) × 10 <sup>3</sup> CFU/mL	35	24–48	M27-A [69]
	Molds	RPMI 1640 <sup>b</sup>	(0.4–5) × 10 <sup>4</sup> CFU/mL	35	48 for most fungi	M38-A [70]
Broth macrodilution	Bacteria	MHB	5 × 10 <sup>3</sup> CFU/mL	35 ± 2	20	M07-A [56]
	Yeast	RPMI 1640 <sup>b</sup>	(0.5–2.5) × 10 <sup>3</sup> CFU/mL	35	46–50	M27-A [69]
	Molds	RPMI 1640 <sup>b</sup>	(0.4–5) × 10 <sup>4</sup> CFU/mL	35	48 for most fungi	M38-A [70]
Agar dilution	Bacteria	MHA	10 <sup>4</sup> CFU/spot	35 ± 2	16–20	M07-A [56]
Time-kill test	Bacteria	MHB	5 × 10 <sup>3</sup> CFU/mL	35 ± 2	0, 4, 18, and 24	M26-A [75]

MHA: Mueller Hinton Agar. MHB: Mueller Hinton Broth.

<sup>a</sup> GMB: the medium was supplemented with 2% glucose and 0.5 mg/mL methylene blue.

<sup>b</sup> RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute medium (with glutamine, without bicarbonate, and with phenol red as a pH indicator) was 1640, buffered to pH 7.0 with MOPS (morpholine propane sulfonic acid) at 0.165 M.

El antibiograma proporciona resultados cualitativos al clasificar las bacterias como susceptibles, intermedias o resistentes. Por lo tanto, es una herramienta de tipificación basada en el fenotipo de resistencia de la cepa microbiana probado, sus resultados también guían a los clínicos en la selección apropiada de los tratamientos empíricos iniciales y los antibióticos utilizados para pacientes individuales en situaciones particulares. Sin embargo, como la inhibición del crecimiento bacteriano no significa la muerte bacteriana, este método no puede distinguir efectos bactericidas y bacteriostáticos <sup>27, 28</sup>.

Además, el método de difusión en disco de agar no es apropiado para determinar la concentración inhibitoria mínima, ya que es imposible cuantificar la cantidad del agente antimicrobiano difundido en el medio de agar. Sin embargo, un MIC aproximado se puede calcular para algunos microorganismos y antibióticos mediante la comparación de las zonas de inhibición con algoritmos.

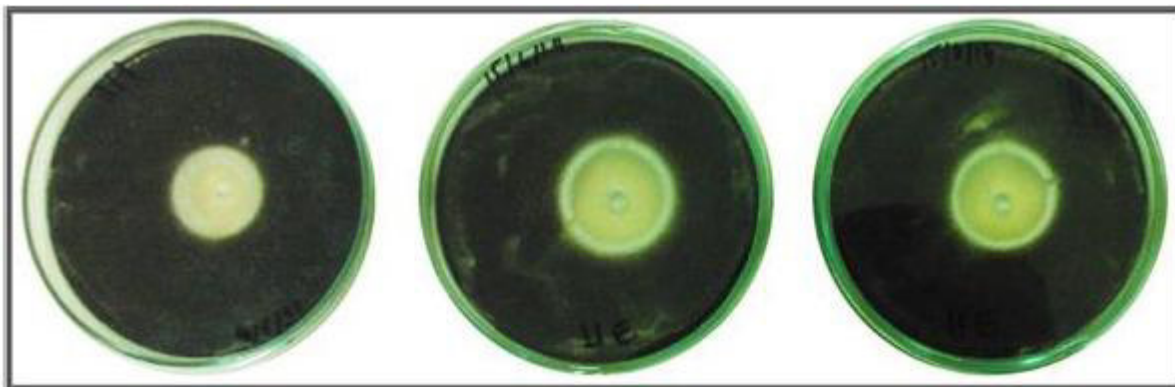
El ensayo de difusión de disco ofrece muchas ventajas sobre otros métodos: simplicidad, bajo costo, capacidad de probar un enorme número de microorganismos y agentes antimicrobianos, y la facilidad para interpretar los resultados proporcionados. Por otra parte, varios estudios han demostrado el gran interés en los pacientes que sufren de infección bacteriana de una antibioterapia basada en el antibiograma del agente causante. Este hecho se debe a la buena correlación entre los datos *in vitro* y la evolución *in vivo* <sup>29, 30</sup>.

Antes de su estandarización, el método de difusión de disco ya se ha utilizado para probar posaconazol contra hongos filamentosos, micafungina contra *Aspergillus*, y caspofungina contra *Aspergillus* y *Fusarium*. Actualmente, un estándar antifúngico de difusión de disco de enfoque se utiliza para probar hongos filamentosos no dermatófito.

Las ventajas mencionadas de este método, principalmente la simplicidad y el bajo costo, han contribuido además a su uso común en el tamizaje antimicrobiano de extractos de plantas, aceites esenciales y otros fármacos <sup>31, 32, 33</sup>.

#### ➤ **Método de difusión de pozos en agar**

El método de difusión de pozos en agar se utiliza ampliamente para evaluar la actividad antimicrobiana de las plantas o extractos microbianos. De forma similar al procedimiento utilizado en el procedimiento de difusión en disco, la superficie de la placa de agar se inocula extendiendo un volumen del inóculo microbiano sobre toda la superficie del agar. A continuación, se perfora asépticamente un orificio con un diámetro de 6 a 8 mm con un taladro de corcho estéril o una punta, y se introduce en el pocillo un volumen (20-100 mL) del agente antimicrobiano o solución de extracto a la concentración deseada. A continuación, las placas de agar se incuban bajo condiciones adecuadas dependiendo del microorganismo de ensayo. El agente antimicrobiano se difunde en el medio de agar e inhibe el crecimiento de la cepa microbiana ensayada (figura 3) <sup>33, 34, 35</sup>.



**Figura 3.** Método de difusión de pozos de agar de aceite esencial utilizando *Aspergillus niger* como microorganismo de ensayo <sup>33</sup>

### 2.2.5. Actividad antioxidante

#### ➤ Radicales libres

Se considera radical libre a aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad.

Los radicales libres pueden llevar a cabo uno de los siguientes tipos de reacciones:

- Ceder su electrón desapareado (radical reductor).
- Aceptar un electrón de la molécula estable para estabilizar el electrón desapareado (radical oxidante).
- Unirse a una molécula estable <sup>36</sup>.

De estas reacciones descritas anteriormente el producto es la formación de otro radical químicamente agresivo:





Esto lo hace muy inestable, reactivo y de vida efímera, con una gran capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados en cada una de estas macromoléculas <sup>37</sup>.

Los radicales libres son elaborados continuamente como producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de atrapamiento). Son componentes normales de células y tejidos, existiendo una poza de radicales libres particular en cada grupo celular y en algunos tipos celulares permiten la mejor adaptación a su hábitat. Al elevarse o disminuir las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno (ROS) puede acarrear desastrosas alteraciones funcionales. La aterosclerosis, el envejecimiento y el cáncer son tres ejemplos de la enorme lista de problemas fisiopatológicos ocasionados por los radicales libres <sup>38</sup>.

Entre los radicales libres, por su importancia se encuentran algunas especies reactivas del oxígeno (ERO) y los lipoperóxidos. La molécula de oxígeno presenta las siguientes especies reactivas:

- $O_2^-$  Anión súper óxido.
- $H_2O_2$  Peróxido de Hidrógeno.

- OH radical hidróxido.
- $^1\text{O}_2$  Oxígeno singlete.

Por su parte, los lipoperóxidos o peróxidos lipídicos (R-COO.) son moléculas de ácidos grasos en las que el grupo hidroxilo de la formación carboxilo se halla en un estado de singlete activado, confiriéndole propiedades de radical libre <sup>39</sup>.

Los radicales libres pueden encontrarse dentro y fuera de la célula manteniendo actividad biológica al oxidarse, dañando principalmente el tejido conjuntivo, proteínas, enzimas, lípidos, membranas celulares, fibras de colágeno, ADN y ARN, entre otros; y su acción también la pueden ejercer sobre los leucocitos favoreciendo su activación anómala, por lo cual están implicados en la producción de enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares <sup>40</sup>.

### ➤ Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se genera en los organismos aerobios cuando la presencia de radicales libres superan las defensas antioxidantes. Esta situación puede deberse a un aporte insuficiente en la dieta de antioxidantes, a una producción excesiva de radicales libres durante el metabolismo de fármacos, o por una activación excesiva del sistema celular.

La agresión de las especies reactivas de oxígeno y lipoperóxidos en las membranas celulares constituye la esencia del daño en el estrés oxidativo,

porque desestabiliza la estructura y función de la célula y sus organelos, debido a que puede constituir causa, en unos casos, y consecuencia en otros de la activación de señalizaciones para la autodestrucción de membranas y muerte celular (apoptosis), ya que la célula no podrá cumplir sus funciones como el intercambio de nutrientes y descartar los materiales de desecho celular, haciendo imposible el proceso de regeneración y reproducción celular <sup>39</sup>.

#### ➤ **Sistemas de defensa antioxidante**

Las reacciones de oxidación son esenciales en los procesos metabólicos celulares. Dichas reacciones involucran la transferencia de electrones que producen radicales libres, los cuales pueden dañar a nuestro cuerpo; sin embargo, existen en las células mecanismos de defensa que neutralizan los radicales libres. A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con un radical libre.

El antioxidante al colisionar con él, le cede un electrón oxidándose y transformándose en un radical libre débil no tóxico. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con los radicales libres. De lo dicho anteriormente se deduce que los antioxidantes pueden ser enzimáticos o no. Estos se clasifican en endógenos (se encuentran en el

organismos y son sintetizados por sus células) y exógenos (ingresan a través de la dieta) (tabla 4).

**Tabla 4.** Clasificación de los antioxidantes<sup>41</sup>

Exógenos	Endógenos
Vitamina E (VE)	Glutación. Coenzima Q
Vitamina C (VC)	Ácido tiótico.
Flavonoides	Superóxido dismutasa (SOD), cobre, manganeso, zinc. Catalasa (CAT), hierro
Licopeno	Glutación peroxidasa (GPX) Selenio

- Vitamina C: Neutraliza el oxígeno singlete. Captura radicales hidroxilo. Regenera la forma oxidada de la vitamina E.
- Vitamina E: Neutraliza el oxígeno singlete. Captura radicales hidroxilo. Captura anión superóxido. Neutraliza peróxidos.
- Betacarotenos: Neutraliza el oxígeno singlete. Neutraliza el oxígeno singlete.
- SOD: Eliminan el anión superóxido.
- CAT y GPX: Previene la reducción del peróxido de hidrógeno para formar el radical hidroxilo.

Dentro de los antioxidantes es importante destacar a ciertos oligoelementos cuya incorporación al organismo es necesaria por constituir parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes. Estos oligoelementos son: cobre, zinc, selenio, magnesio y hierro <sup>41</sup>.

➤ **Medición de la actividad antioxidante**

La medición del efecto antioxidante no se puede determinar en forma directa, pero si se puede determinar midiendo el efecto sobre otra sustancia que emita radicales libres, valorando una especie intermedia o el producto final de una oxidación controlada.

La actividad antioxidante de una muestra puede ser medida basándose en varios ensayos de pruebas, según su naturaleza hay métodos más exactos que otros, sin embargo esto también es un problema a la hora de comparar los resultados de los ensayos. Esta medición se puede clasificar según el mecanismo de reacción, por la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) o la transferencia de electrones (TE). A continuación se detalla en la siguiente tabla

5<sup>42, 43</sup>.

**Tabla 5.** Ensayos para la medición de la actividad antioxidante<sup>42</sup>

Ensayo	Categoría
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)</li> <li>• 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH)</li> <li>• Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)</li> <li>• N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD)</li> <li>• Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CURRAC)</li> </ul>	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC).</li> <li>• Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP).</li> <li>• Inhibición de la oxidación del ácido linoleico.</li> <li>• Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad (LDL).</li> </ul>	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)

En los últimos años se han adoptado un amplio rango de ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales. Usualmente los ensayos antioxidantes *in vitro* utilizan un captador de radicales libres y son relativamente sencillos de realizar. Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método del DPPH es el más rápido, simple y de menor costo en comparación con otros modelos <sup>44</sup>.

- **Método del DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)**

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es uno de los pocos radicales orgánicos estables, presenta una coloración violeta, es comercialmente disponible y no tiene que ser generado *in situ* como el ABTS. El método fue propuesto por Brand-Williams y se basa en la medición de la capacidad antioxidante para estabilizar el radical DPPH. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox <sup>45</sup>.

La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC<sub>50</sub>), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%.

Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor IC<sub>50</sub> cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH usado.

El método del DPPH tiene algunas ventajas entre las que se encuentran:

- Es un método rápido y reproducible en comparación con otros métodos para la determinación de la actividad antioxidante.
- Es simple (no incluye muchos pasos durante el proceso).
- Es el de menor costo en comparación con otros modelos <sup>46</sup>.

### 2.2.6. Actividad citotóxica

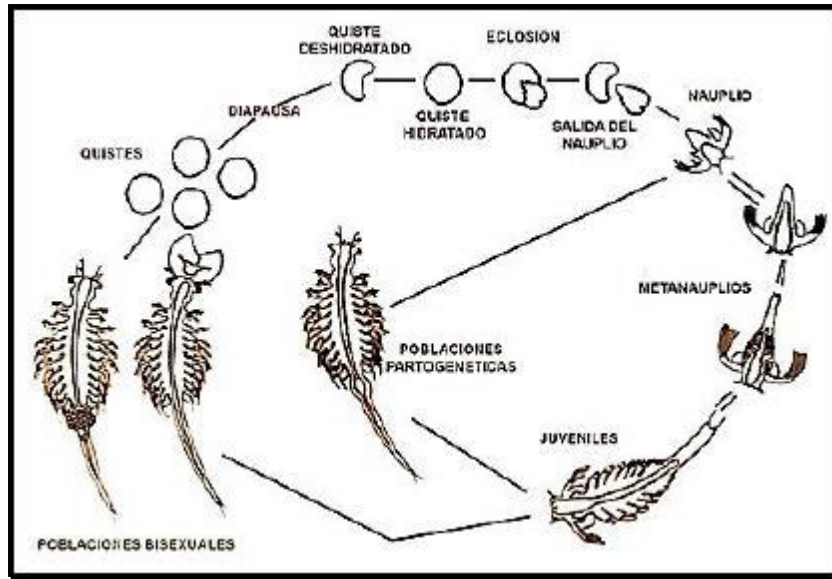
#### ➤ Citotoxicidad

La citotoxicidad es un parámetro biológico que se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño fenotípico. El análisis de citotoxicidad es de uso corriente en el laboratorio, debido a la facilidad de su medición y por el empleo de parámetros de clasificación de uso común, como la relación dosis dependiente de Paracelso, que permiten diferenciar si el compuesto químico al que se exponen las células, se puede catalogar como tóxico o como medicamento <sup>60</sup>.

#### ➤ Artemia salina

*Artemia salina* es un crustáceo que vive en ambientes salinos, soportando varios rangos de concentración salina. Esta especie vive en el océano o en pequeñas pozas de agua. Cuando son sexualmente maduros presentan once pares de apéndices en forma de pluma, Cuando una *Artemia* crece y se desarrolla, muda su piel unas 12 veces, el número de segmentos corporales y de pelos se incrementan. La concentración de sal en el medio donde crecen afecta la tasa de crecimiento <sup>47</sup>.





**Figura 4.** Ciclo vital de *Artemia salina*<sup>47</sup>



**Figura 5.** Etapas de desarrollo de *Artemia salina*<sup>47</sup>

#### ➤ **Concentración letal media (CL<sub>50</sub>)**

Concentración Letal Media CL<sub>50</sub> es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado. El valor de la

CL<sub>50</sub> se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen (miligramos por litro, mg/L) <sup>48</sup>.

➤ **Bioensayo de letalidad frente a *Artemia salina***

Uno de los biomodelos más utilizados en las etapas preliminares de la investigación fitoquímica, es el bioensayo de letalidad frente a *Artemia salina*, desarrollada en 1982 por Meyer y col. El procedimiento consiste en exponer compuestos activos y/o extractos de plantas a nauplios de *Artemia salina*, para determinar valores de concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), expresada en g/mL. Sin embargo, los valores obtenidos de CL<sub>50</sub>, no advierten una actividad fisiológica o biológica en particular; son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar investigaciones más específicas. La toxicidad en vivo de un organismo animal puede usarse como método conveniente para el seguimiento y fraccionamiento en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos <sup>49</sup>.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Tipo de estudio

Experimental y analítico<sup>61</sup>

#### 3.2. Materiales, equipos y reactivos

##### ➤ Material botánico

- Hojas y tallos de *Tagetes multiflora* Kunth

##### ➤ Material biológico

- *Artemia salina*
- *Aspergillus niger* ATCC 16404
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Candida albicans* ATCC 14053
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

##### ➤ Equipos de Laboratorio

- Autoclave Kachel
- Balanza analítica OHAUS, modelo AP110S, serie N79876
- Baño maría Memmert

- Espectrofotómetro UV Vis 50Bio Modelo: Cary50 Marca: Merck peruana
- Estufa Memmert
- Equipo de burbujeo para pecera
- Horno esterilizador. Marca MEMMERT
- Incubadora calibrada a 37 °C. Marca MEMMERT
- Lámpara UV Merck
- Lámpara doméstica
- Molino de cuchillas Willey Mill
- Micropipeta 5-50 µL modelo Transferpette marca Brand
- Micropipeta 10-100 µL modelo Transferpette marca Brand
- Micropipeta 100-1000 µL modelo Transferpette marca Brand
- Pipetas
- Tamiz N° 20

➤ **Materiales de laboratorio**

- Cubetas cromatográficas
- Embudos
- Frascos de color ámbar
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitados de 100 y 250 mL
- Viales 5 mL
- Placas Petri desechables

- Tubos falcon 15 mL
- Asa de Kohl
- Gradillas
- Sacabocados
- Gasa estéril
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Papel Kraft
- Cromatoplasmas TLSílice gel 60 F24 20x20 cm (Merck)

#### ➤ **Reactivos**

- Agua destilada y bidestilada
- Ácido acético QP (Merck)
- Acetona (Merck)
- Butanol P.A (Merck)
- Estándares de ácido gálico y ácido tánico (Merck)
- Estándares de quercetina y rutina (Sigma-Aldrich, USA)
- Etanol 96° (Merck)
- Metanol P.A (Merck)
- Tricloruro férrico y tricloruro de aluminio (Merck)
- Agar Mueller Hinton
- Agar Sabouraud

- Agar Tripticasa soja
- Discos de gentamicina 10 µg, fluconazol 25 µg (Merck)
- Peptona
- Solución salina fisiológica al 0,85%
- Trolox (Sigma-Aldrich, USA)

### **3.3. Recolección del material vegetal**

La especie vegetal *Tagetes multiflora* Kunth se recolectó en la localidad de Urmayno (límite entre la comunidad de Laraos y Huantan), distrito de Laraos, provincia de Yauyos, departamento de Lima, Perú. Coordenadas 407621 N, 8628708 W a 2740 metros de altitud. La identificación de la planta fue realizada por el M.Sc. Hamilton Beltrán (C.B.P. 2719) en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Farmacognosia, Botánica y en el laboratorio del Centro Latinoamericano de Enseñanza e Investigación en Bacteriología Alimentaria (CLEIBA) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

### **3.4. Estabilización de la muestra**

La cantidad de planta recolectada fue 4,350 Kg. Se procedió con la selección de las hojas y tallos, los cuales se lavaron para eliminar tierra y sustancias extrañas. Luego se desecó en los ambientes del Laboratorio de Farmacognosia

de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, a temperatura ambiente y en sombra durante seis días y luego se completó el secado en una estufa marca Memmert a 45 °C. Debido a que las hojas de la planta eran pequeñas se decidió moler en forma conjunta las hojas y tallos. La molienda se realizó en un molino de cuchillas Wiley Mill con malla de 2 mm y se obtuvo 826,45 g de muestra total molida (hojas y tallos)

### 3.5. Preparación de los extractos etanólico y acuoso

a) **Extracto alcohólico seco:** Para la obtención del extracto etanólico seco por maceración, se pesó 500 g de muestra molida y se adicionó 2,5 L de etanol de 96° en un frasco ámbar herméticamente cerrado. Se procedió a mezclar el extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth mediante agitación mecánica durante 15 minutos y luego se almacenó a temperatura ambiente y a oscuridad durante 7 días, agitando cada día por cinco minutos para favorecer la extracción.

Cumplido el tiempo de maceración, se filtró el extracto utilizando gasa estéril y luego se volvió a filtrar con papel Whatman, Posteriormente, el filtrado se colocó en dos fuentes pirex y se concentró en una estufa marca Memmert a 40°C por tres días. Se calculó el rendimiento del extracto de la siguiente manera <sup>44</sup>:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso extracto seco} \times 100}{\text{Peso de hojas y tallos molidos}}$$

Este extracto se utilizó para evaluar las actividades antimicrobiana, antioxidante y citotoxicidad.

- b) Extracto acuoso seco:** Se pesó 10 g de muestra molida y se adicionó 50 mL de agua destilada y por cocimiento, se llevó a baño María a 70 °C por 20 minutos. Posteriormente, se filtró en gasa estéril y papel Whatman, se colocó en una placa Petri y se concentró en una estufa marca Mermmet a 40°C por 24 horas. Se calculó el rendimiento del extracto de la siguiente manera<sup>44</sup>:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso extracto seco} \times 100}{\text{Peso de hojas y tallos molidos}}$$

Este extracto se utilizó para evaluar las actividades antioxidante y citotoxicidad.

- c) Extracto acuoso fresco:** Se preparó al 20% por cocimiento a 70 °C por 20 minutos en baño maría en cantidades suficientes para cada ensayo. Este extracto se utilizó para evaluar la actividad antimicrobiana.

### 3.6. Marcha de solubilidad

Se colocó aproximadamente 1 mL de extracto etanólico seco y extracto acuoso seco de *Tagetes multiflora* Kunth en tubos de ensayos, se añadió aproximadamente 3 mL de solventes con diferentes polaridades: agua destilada, etanol, metanol, acetona, cloroformo, n-hexano y éter dietílico.



### 3.7. Tamizaje fitoquímico

Se realizó pruebas de coloración y precipitación a ambos extractos con la finalidad de determinar la presencia de metabolitos.

### 3.8. Cromatografía en capa fina <sup>63, 64</sup>

#### ➤ **Determinación de taninos**

Para la determinación de taninos, se utilizó cromatoplasmas de Thin-layer sílice gel 60 F24 de 20 x 20 cm marca Merck KGa (fase estacionaria). Con la ayuda de capilares, se sembraron los extractos etanólico seco previamente solubilizado en acetona y el extracto acuoso fresco que se preparó en el momento. Posteriormente, se sembraron los estándares de ácido tánico y gálico previamente disueltos en acetona y agua. Luego, las cromatoplasmas fueron colocadas en cubetas, previamente saturadas con el sistema de solvente butanol, ácido acético y agua en la proporción de 4:1:5 respectivamente (fase móvil). Después de haber cumplido el recorrido, cada placa fue revelada con luz UV y FeCl<sub>3</sub>.

#### ➤ **Determinación de flavonoides**

Para la determinación de flavonoides se utilizó cromatoplasmas de Thin-layer sílice gel 60 F24 de 20 x 20 cm marca Merck KGa (fase estacionaria). Con la ayuda de capilares, se sembraron los extractos etanólico seco previamente solubilizado en acetona y el extracto acuoso fresco que se preparó en el momento. Posteriormente, se sembraron los estándares de ácido rutina y

quercetina previamente disueltos en acetona y agua. Luego, las cromatoplasmas fueron colocadas en cubetas, previamente saturadas con el sistema de solvente acetato de etilo, metanol y agua en la proporción de 100:13,5:10 respectivamente (fase móvil). Después de haber cumplido el recorrido, cada placa fue revelada con luz UV y  $\text{AlCl}_3$  10%.

➤ **Determinación de saponinas esteroidales**

Para la determinación de saponinas esteroidales, se utilizó como fase estacionaria cromatoplasmas de Thin-layer sílice gel 60 F24 de 20 x 20 marca Merck KGa (fase estacionaria). Con la ayuda de capilares, se sembraron los extractos etanólico seco previamente solubilizado en acetona y el extracto acuoso fresco que se preparó en el momento. Se utilizaron como estándares extractos de raíz de *Polygala virginiana* y raíz de *Smilax officinalis* “zarzaparrilla” que se obtuvieron por cocimiento en baño a 70° por 20 minutos, previamente reducidos de tamaño. Posteriormente, se sembraron los estándares y cromatoplasmas fueron colocadas en cubetas, previamente saturadas con el sistema de solvente etanol, butanol e hidróxido de amonio en la proporción de 2:5:7 respectivamente (fase móvil). Después de haber cumplido el recorrido, cada placa fue revelada con vainillina y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10% y posteriormente se calentó en cocinilla.

### 3.9. Evaluación de la actividad antimicrobiana: Método de difusión de pozos en agar

#### ➤ **Método de difusión de pozos en agar**

##### **a) Fundamento:**

Se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido, la que se evidencia con la formación de halos de inhibición.

#### ➤ **Microorganismos:**

- *Aspergillus niger* ATCC 16404
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Candida albicans* ATCC 14053
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

#### ➤ **Preparación de la suspensión del inóculo**

Las colonias aisladas fueron seleccionadas de un cultivo en placa de agar. Tripticasa de soya (TSA) después de 18 a 24 horas a 35°C para las bacterias y agar Dextrosa Sabouraud después 3 a 5 días de incubación a 25°C para hongos. El inóculo se preparó mediante una suspensión directa en solución

salina al 0.85% de las colonias aisladas y se ajustó la turbidez del inóculo utilizado al tubo N° 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) de la escala Mac Farland.

➤ **Preparación de las placas**

El medio de cultivo empleado fue Agar Mueller Hinton para las bacterias y agar dextrosa Sabouraud para levaduras y hongos, previamente esterilizado en autoclave a 121°C x 15 min. Posteriormente se agregó 1 mL de suspensión del inóculo por cada 100 mL de medio de cultivo, mezclados asépticamente, se agitó suavemente y se repartió 20 mL uniformemente en cada placa Petri, luego se dejó solidificar y se rotuló cada placa. Posteriormente se hizo pozos excavados en el mismo medio de cultivo, con la ayuda de un sacabocado de acero inoxidable de 10 mm de diámetro interno, distribuidos equitativamente en el interior de cada placa.

➤ **Preparación de las muestras**

Para el ensayo se usó el extracto etanólico seco y el extracto acuoso fresco al 20%.

**a) Control negativo:**

Se realizó con etanol al 96° para los extractos alcohólicos y agua destilada en el caso de los extractos acuosos.

**b) Controles Positivos:**

Discos de antibióticos: Gentamicina 10 µg/disco (Merck) y Fluconazol 25 µg/disco (Merck).

➤ **Inoculación e Incubación**

Se colocó 0.1 mL de las diluciones de los extractos etanólico y acuoso en los pozos hechos previamente en cada placa. Se dejó reposar por 1 hora a temperatura ambiente y luego se llevó a una temperatura de incubación de 35°C por 24 horas para las bacterias y a 25 °C por 3 a 5 días para la levadura y hongo.

➤ **Lectura e Interpretación**

Después de transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la observación y lecturas de las zonas claras de inhibición del crecimiento bacteriano, y se procedió a realizar la medición de los diámetros (en mm) de estas zonas. La Tabla 10 indica el promedio de los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano y se realizó la prueba por triplicado con la finalidad de obtener datos significativos.

Para la interpretación de los resultados, se tomó como referencia la escala de Duraffourd que es utilizada para evaluar cualitativamente el efecto inhibitorio *in vitro* según el diámetro de inhibición:

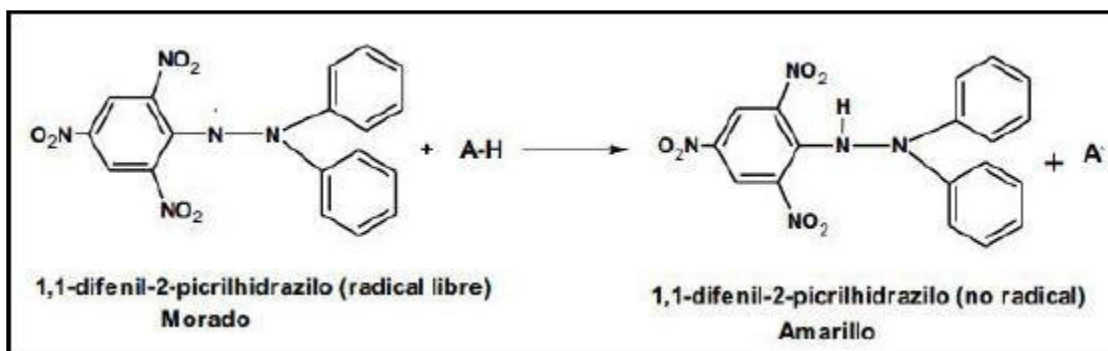
**Tabla 6.** Escala de Duraffourd para determinar el efecto inhibitorio según el diámetro de inhibición <sup>50</sup>

<b>Nula</b>	<b>-</b>	Menor o igual a 8 mm
<b>Sensible</b>	<b>+</b>	9 – 14 mm
<b>Muy sensible</b>	<b>++</b>	15 – 19 mm
<b>Sumamente sensible</b>	<b>+++</b>	Mayor o igual a 20 mm

Se realizó un análisis estadístico a través de la prueba ANOVA entre los resultados de las muestras analizadas.

### 3.10. Evaluación de la actividad antioxidante: Método de captación del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

**Fundamento:** La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa. Esta deslocalización del electrón intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta vira a un color amarillo o transparente, como se muestra en la figura 6.



**Figura 6.** Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante <sup>44</sup>

El cambio de color es monitoreado a través del espectrofotómetro y es utilizado para cuantificar la actividad antioxidante que poseen distintas sustancias.

Los resultados se pueden expresar como coeficiente de inhibición ( $IC_{50}$ ), porcentaje de inhibición y cuando es comparado con estándares se utilizan sustancias de referencias trolox o vitamina C y se expresan como mg equivalentes Trolox o mg equivalente vitamina C <sup>42, 44, 51</sup>.

### ➤ Procedimiento

Se preparó una solución del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) para la cual se pesó 3 mg de DPPH y se enrasó en una fiola de 25 mL de metanol, se cubrió con papel aluminio para evitar su rápida degradación y se agitó para homogenizar la solución.

Se prepararon diluciones del extracto seco etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth con etanol y para el extracto acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth con agua bidestilada, a una concentración inicial de 800  $\mu\text{g/mL}$ , a partir de ésta

solución stock, se prepararon diferentes diluciones obteniéndose concentraciones de 300, 180, 120, 60 y 30  $\mu\text{g/mL}$  para el extracto etanólico y 225, 150, 75, 37.5, 18.75  $\mu\text{g/mL}$  para el extracto acuoso.

A partir de las diluciones anteriormente descritas, se procedió a preparar una nueva batería de tubos para someterlos a la acción del DPPH. Se agregó en tubos 0,8 mL de solución de los extractos etanólico y acuoso con 1,6 mL de la solución de DPPH, obteniéndose concentraciones finales de 100, 60, 40, 20 y 10  $\mu\text{g/mL}$  para el extracto etanólico y 75, 50, 25, 12,5 y 6,25  $\mu\text{g/mL}$  para el extracto acuoso. Los blancos de muestras se prepararon por triplicado añadiendo 0,8 mL de extracto en 1,6 mL metanol. Para los blancos de DPPH se prepararon agregando 0,8 mL de metanol con 1,6 mL de DPPH también por triplicado.

Para la preparación de la curva de calibración del estándar trolox, se pesó 5 mg de Trolox y se disolvió en 50 mL de solvente agua: etanol (1:1). De esta solución stock, se prepararon diferentes diluciones obteniéndose concentraciones de 18,75; 15; 11,25; 7,5 y 3,75  $\mu\text{g/mL}$ . A partir de estas diluciones, se procedió a preparar una nueva batería de tubos para someterlos a la acción del DPPH. Se agregó en tubos 0.8 mL de las diluciones anteriormente descritas con 1,6 mL de la solución de DPPH, obteniéndose concentraciones finales de 6,25; 5; 3,75; 2,5; 1,25  $\mu\text{g/mL}$ .



También se prepararon los blancos de espectro con 4 mL de metanol y 2 mL de agua bidestilada (proporción 2:1) para el blanco del extracto acuoso y 4 mL de metanol y 2 mL de etanol para el blanco del extracto etanólico. Se taparon todos los tubos con parafilm, se agitaron con la ayuda de un equipo vortex y se dejaron reposar por 30 minutos en la oscuridad. Se leyeron en el espectrofotómetro a 517 nm.

La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente ecuación <sup>55</sup>:

$$\% \text{ Inhibicion} = \frac{(Abs.DPPH - Abs.muestra)}{Abs.DPPH} \times 100$$

Donde:

Abs. DPPH = Absorbancia de DPPH

Abs. Muestra = Absorbancia de muestra

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como valores de porcentaje de inhibición, concentración media inhibitoria (IC<sub>50</sub>) en µg/mL y como valores TEAC (Capacidad antioxidante equivalente de Trolox: µg equivalente Trolox / mg de extracto).

El IC<sub>50</sub> se determinó a partir de la gráfica absorbancia versus concentraciones de cada extracto; y corresponde a la concentración en la que se neutraliza el 50% de los radicales libres del DPPH.

La capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC) de un extracto representa la concentración de la solución trolox que tiene la misma capacidad captadora de radicales libres que el extracto<sup>42</sup>. El TEAC se determinó a partir de las gráficas absorbancia vs concentración de los extractos y del estándar trolox.

Los valores fueron registrados como la media y su desviación estándar. Además, los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba de Tukey para determinar las diferencias entre las medias a través del programa estadístico SPSS 24. Se consideraron significativos valores de  $p < 0.05$ .

### **3.11. Evaluación de la actividad citotóxica: Bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina* (CYTED)**

La actividad citotóxica de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* kunth, se realizó de acuerdo al Manual de Técnicas de Investigación del CYTED<sup>52</sup>.

Los quistes de *Artemia salina* fueron donados por la Autoridad Nacional del Agua y almacenados en refrigeración.

## ➤ Procedimiento

El bioensayo con *Artemia salina* es un método que permite determinar citotoxicidad en la larva de este crustáceo que es altamente sensible a una gran variedad de sustancias químicas. La toxicidad se expresa como CL<sub>50</sub> (concentración letal 50).

**Día 1:** Se preparó agua de mar pesando 19 gramos de sal y se disolvió en 500 mL de agua. Luego se realizó un filtrado por duplicado.

Se pesó 50 mg de huevos de *Artemia salina* en un beacker 350 mL de agua de mar preparado. Se colocó luz artificial y se introdujo en el agua una bomba de oxígeno con burbujeo lento. Se dejó incubar por 24 horas.

**Día 2:** Para la preparación de la solución madre de los extractos secos etanólico y acuoso, se disolvió 20 mg de cada extracto y se llevó a 10 mL de agua destilada. A partir de estas soluciones se prepararon diluciones de 100, 50, 25, 10, 5 µg/mL para el extracto etanólico, transfiriendo a cada vial una cantidad correspondiente para llevar a un volumen final de 10 mL. Para el caso del extracto acuoso se prepararon diluciones de 500, 400, 300, 200, 100 µg/mL transfiriendo a cada vial una cantidad correspondiente para llevar a un volumen final de 10 mL. Cada concentración se realizó por triplicado. Además, se incluyó un grupo control también por triplicado para cada extracto. Posteriormente, a cada vial con extracto se le agregó 10 nauplios y se completó con agua destilada hasta llegar a un volumen de 10 mL.

**Conteo de nauplios:** El conteo de nauplios sobrevivientes se realizó a las 24 horas después de iniciado la incubación.

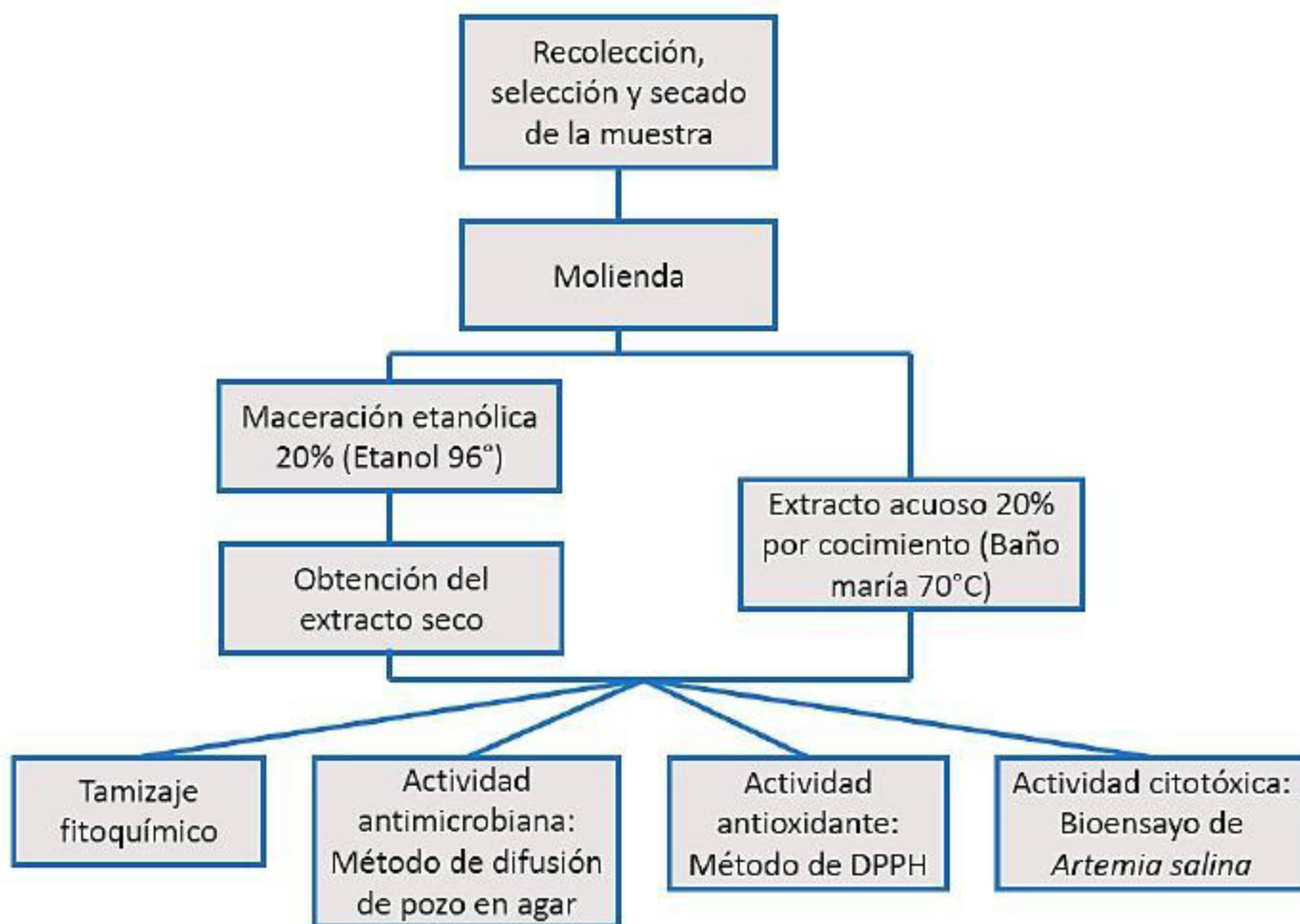
**Análisis de datos:** Se calculó la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) con la ayuda del análisis de regresión logarítmico PROBIT a través del programa estadístico SPSS 22.

Para la clasificación se tomó como referencia las recomendaciones del CYTED como indica en la tabla 7 <sup>52</sup>.

**Tabla 7.** Clasificación de toxicidad según CYTED<sup>52</sup>

I	Extremadamente tóxico	0-10	µg/mL
II	Altamente tóxico	10-100	µg/mL
III	Moderadamente tóxico	100-500	µg/mL
IV	Ligeramente tóxico	500-1000	µg/mL
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500	µg/mL
VI	Relativamente inocuo	<1500	µg/mL

### 3.12. Esquema de los procedimientos experimentales.



**Figura 7.** Diagrama de flujo de la metodología

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Rendimiento de los extractos etanólico y acuoso

Se obtuvo 2,73 g de extracto etanólico en 100 g de hojas y tallos molidos de *Tagetes multiflora* Kunth. Por otro lado, se obtuvo 1,50 g de extracto acuoso en 100 g de hojas y tallos molidos de *Tagetes multiflora* Kunth.

**Tabla 8.** Rendimiento de los extractos etanólico y acuoso *Tagetes multiflora* Kunth

Especie	Solvente			
<i>Tagetes multiflora</i> Kunth	Etanol 96°	500	13,65	<b>2,73</b>
	Agua	10	0,15	<b>1,50</b>

### 4.2. Marcha de solubilidad

El extracto etanólico seco resultó ser insoluble solamente en agua y soluble y muy soluble en solventes orgánicos.

**Tabla 9.** Ensayo de solubilidad del extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth

Solvente	Resultados
Agua destilada	-
Etanol 96°	+++
Metanol	++++
Acetona	+++
Cloroformo	+++
n-hexano	+++
Éter dietílico	++++

**Leyenda:** (-) Insoluble, (+) Poco soluble, (++) Medianamente soluble, (+++) Soluble, (++++)  
Muy soluble.

El extracto acuoso seco resultó ser insoluble en etanol 96°, metanol, acetona, cloroformo, n-hexano y éter dietílico.

**Tabla 10.** Ensayo de solubilidad del extracto acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth

Solvente	Resultados
Agua destilada	++++
Etanol 96°	-
Metanol	-
Acetona	-
Cloroformo	-
n-hexano	-
Éter dietílico	-

**Leyenda:** (-) Insoluble, (+) Poco soluble, (++) Medianamente soluble, (+++) Soluble, (++++)  
Muy soluble.

#### 4.3. Tamizaje fitoquímico

Los resultados del estudio fitoquímico demostró que el extracto etanólico no presenta alcaloides y compuestos con grupo carbonilo. En el caso del extracto acuoso no se encontraron alcaloides, compuestos con grupos carbonilos y saponinas.

**Tabla 11.** Tamizaje fitoquímico de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth

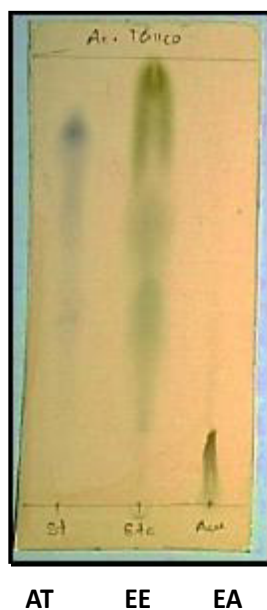
COMPUESTO	REACCIÓN	RESULTADOS	
		Extracto etanólico	Extracto acuoso
Azúcares	Molish	+++	+++
	Antrona	+++	-
Taninos	FeCl <sub>3</sub>	+++	+++
	Gelatina	+++	+
Aminoácidos libres	Rvo. Ninhidrina	++	+++
Flavonoides	Rvo. Shinoda	++	+++
Triterpenoides y esteroides	Lieberman – Burchardat	+++	+++
Alcaloides	Mayer	-	-
	Dragendorff	-	-
	Rvo. Rosenheim	+++	+++
Grupo carbonilo	Hidroxilamina	-	-
Glicósidos	Rvo. Vainillina	+++	+
	Borntrager	++	+
Azúcares reductores	Fehling	+++	+++
	Benedict	+++	+++
Saponinas	Espuma	++	-

**Leyenda:** (-) ausencia de metabolito, (+) Baja cantidad, (++) Ligera cantidad, (+++) Elevada cantidad



#### 4.4. Cromatografía en capa fina

En las cromatografías para evaluar taninos, se observó mayor concentración de ácido gálico, después de revelar con tricloruro férrico en los extractos etanólico ( $R_f = 0,87$ ) y acuoso ( $R_f = 0,90$ ) y sus distancias recorridas fueron similares al estándar ( $R_f = 0.87$ ) lo que indicaría mayor presencia de taninos hidrolizables.



**Figura 8.** Cromatograma con estándar ácido tánico y revelador  $\text{FeCl}_3$  10%. AT: Ácido tánico, EE: extracto etanólico y EA: Extracto acuoso.

Fase móvil: Butanol – Ácido acético – Agua (4:1:5) (BAW)

Distancia Fase móvil: 6,0 cm

Distancia AT: 5,2 cm  $R_{fAT}$ : 0,87

Distancia EE: 5,2 cm  $R_{fEE}$ : 0,87

Distancia EA: 5,4 cm  $R_{fEA}$ : 0,90



**Figura 9.** Cromatograma con estándar ácido gálico y revelador  $\text{FeCl}_3$  10%. AG: Ácido gálico, EE: extracto etanólico y EA: Extracto acuoso.

Fase móvil: Butanol – Ácido acético – Agua (4:1:5) (BAW)

Distancia Fase móvil: 6.0 cm

Distancia AG: 5,2 cm  $R_{fAG}$ : 0,87

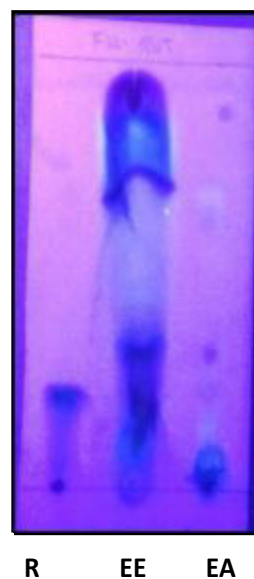
Distancia EE: 5,3 cm  $R_{fEE}$ : 0,88

Distancia EA: 5,3 cm  $R_{fEA}$ : 0,88

En las cromatografías para evaluar flavonoides, se observó mayor concentración de quercetina en el extracto etanólico ( $R_f = 0,83$ ) antes y después del revelado con luz UV 366 nm y con tricloruro de aluminio cuyo recorrido fue igual al estándar ( $R_f = 0,83$ ).



**Figura 10.** Cromatograma con estándar de rutina. R: Rutina, EE: Extracto etanólico, EA: Extracto acuoso.



**Figura 11.** Cromatograma con estándar de rutina y revelador  $AlCl_3$  10 % en luz UV.

Fase móvil: Acetato de etilo – Metanol - Agua (100:13,5:10)

Distancia Fase móvil: 6,0 cm

Distancia R: 1,5 cm  $R_{fR}$ : 0,25

Distancia EE: 1,5 cm  $R_{fEE}$ : 0,25

Distancia EA: 4,1 cm  $R_{fEA}$ : 0,68



**Figura 12.** Cromatograma con estándar rutina y con revelador  $FeCl_3$  10%.



Q EE EA

**Figura 13.** Cromatograma con estándar de quercetina. Q: Quercetina, EE: Extracto etanólico, EA: Extracto acuoso. Fase móvil: Acetato de Quercetina, Metanol, Agua (100:13,5:10)

Distancia Fase móvil: 6,0 cm

Distancia Q: 5 cm Rf<sub>Q</sub>: 0,83

Distancia EE: 5 cm Rf<sub>EE</sub>: 0,83

Distancia EA: 3,7 cm Rf<sub>EA</sub>: 0,62



Q EE EA

**Figura 14.** Cromatograma con estándar de quercetina y revelador  $\text{AlCl}_3$  10% en luz UV. Q: Quercetina, EE: Extracto etanólico, EA: Extracto acuoso.



Q EE EA

**Figura 15.** Cromatograma con estándar quercetina y con revelador  $\text{FeCl}_3$  10%.

En el caso de las cromatografías para evaluar saponinas esteroidales, después de revelar con vainillina, ácido clorhídrico 10% y luego de ser calentado en coccinilla, se observó mayor concentración en el extracto acuoso ( $R_F = 0,47$ ) cuya mancha se encontró a la misma altura del estándar raíz de *Polygala virginiana* ( $R_f = 0,47$ ) lo que indicaría la presencia de saponinas triterpenoides.



**Figura 16.** Cromatograma de raíz de *Polygala virginiana* como estándar. RP: Raíz polígala, EE: Extracto etanólico, EA: Extracto acuoso.



**Figura 17.** Cromatograma de los extractos etanólico, acuoso y raíz de *Polygala virginiana* como estándar y con revelador vainillina más  $H_2SO_4$  10% después de ser calentado en coccinilla.

Fase móvil: Etanol – Butanol – Hidróxido de amonio (2:5:7)

Distancia Fase móvil: 6,0 cm

Distancia RP: 2,8 cm  $R_{fRP}$ : 0,47

Distancia EE: 3 cm  $R_{fEE}$ : 0,50

Distancia EA: 2,8 cm  $R_{fEA}$ : 0,47



**Figura 18.** Cromatograma de raíz de *Smilax officinalis* “zarzaparrilla” como estándar. Z: Zarzaparrilla, EE: Extracto etanólico, EA: Extracto acuoso.



**Figura 19.** Cromatograma de los extractos etanólico, acuoso y raíz de *Smilax officinalis* “zarzaparrilla” como estándar y con revelador vainillina más  $H_2SO_4$  10% después de ser calentado en cocinilla.

Fase móvil: Etanol – Butanol – Hidróxido de amonio (2:5:7)

Distancia Fase móvil: 6,0 cm

Distancia Z: 2,7 cm  $R_{fz}$ : 0,45

Distancia EE: 2,7 cm  $R_{fEE}$ : 0,45

Distancia EA: 2,9 cm  $R_{fEA}$ : 0,48

#### 4.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana: Método de difusión de pozo en agar

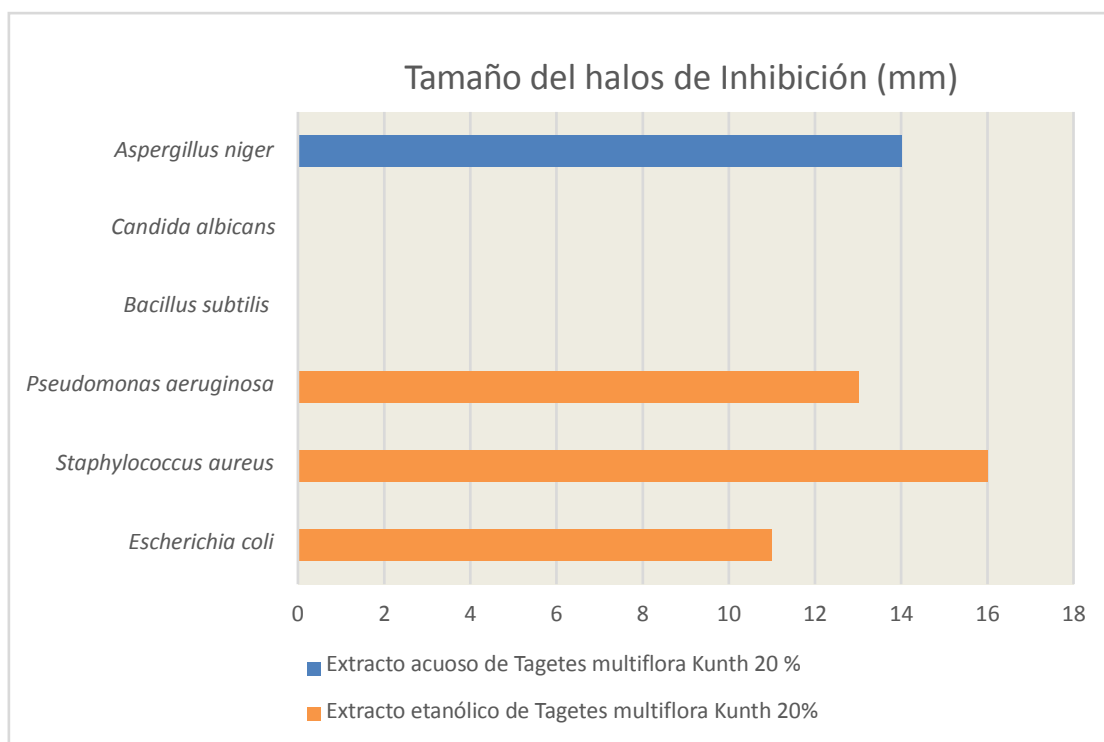
En la evaluación de la actividad antimicrobiana, los resultados se presentan en la tabla 11 y en las figuras 20 al 26. En la tabla 11 y en las figuras 21, 22, 23, se aprecia que las cepas *Escherichia coli* ( $11,33 \pm 0,58$  mm) y *Pseudomonas aeruginosa* ( $13 \pm 1,0$  mm) fueron sensibles al extracto etanólico seco de *Tagetes multiflora* kunth; y frente a *Staphylococcus aureus* ( $15,67 \pm 1,15$  mm) resultó ser muy sensible según la escala de Duraffourd. En la misma tabla y en la figura 25, se observó que solamente la cepa *Aspergillus niger* ( $13,67 \pm 0,58$  mm) fue sensible al extracto acuoso fresco de *Tagetes multiflora*, conforme a la escala de Duraffourd.

**Tabla 12.** Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano (mm)

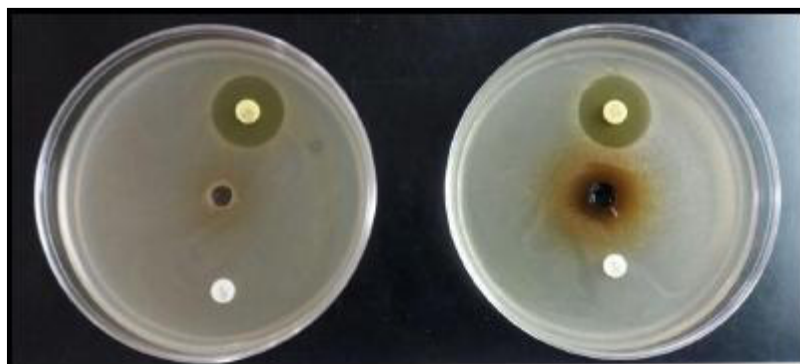
Muestras	Microorganismos					
Extracto etanólico de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.	11,33 $\pm$ 0,58	15,67 $\pm$ 1,15	13 $\pm$ 1	NP	NP	NP
Extracto acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth.	NP	NP	NP	NP	NP	13,67 $\pm$ 0,58
Controles	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Agua destilada	NP	NP	NP	NP	NP	NP
Etanol	NP	10	NP	NP	NP	NP
Gentamicina	25	35	27	37		
Fluconazol					17	NP

Leyenda: (NP) No presentó halo de inhibición

En la figura 20, se compara la actividad antimicrobiana de los extractos por la formación de halos de inhibición, donde se observa que para el extracto etanólico, hubo formación de halo en tres cepas, mientras que para el extracto acuoso solo uno.

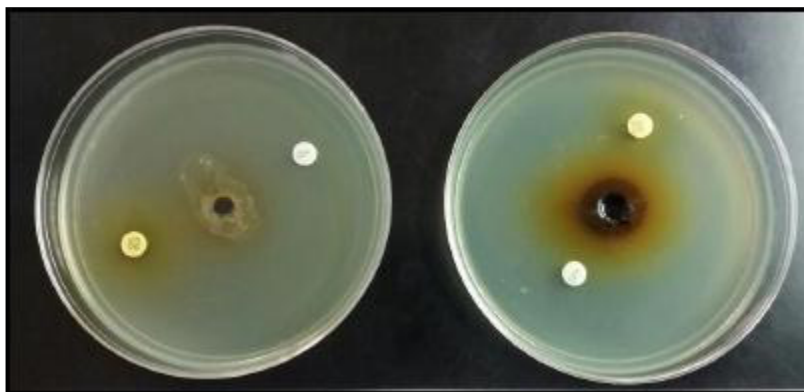


**Figura 20.** Halo de inhibición de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth

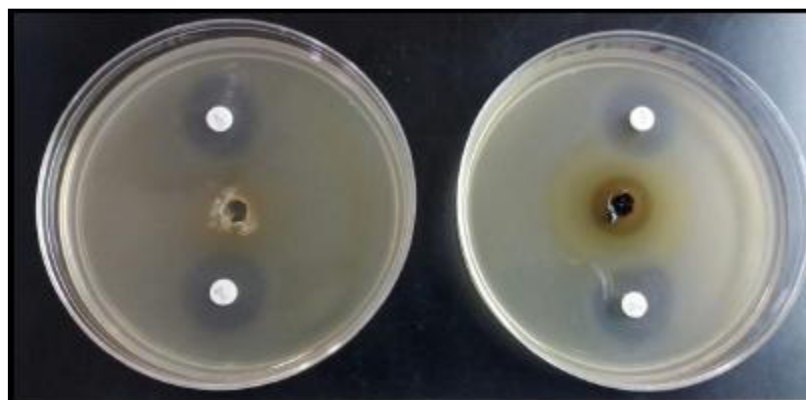


**Figura 21.** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico (derecha) y acuoso (izquierda) al 20 % de *Tagetes multiflora* Kunth en *Escherichia coli* con estándar gentamicina.

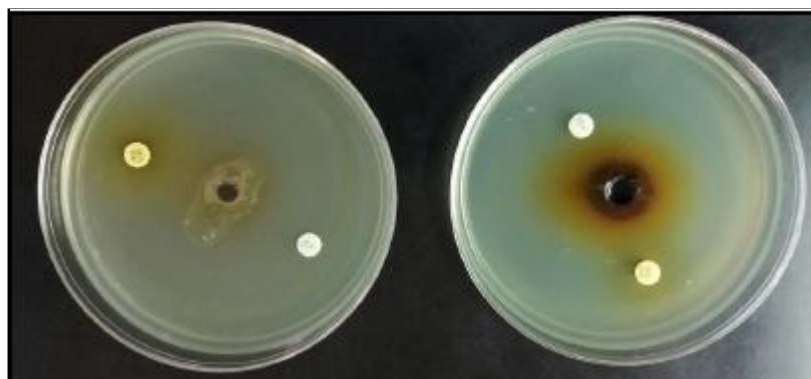




**Figura 22.** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico (derecha) y acuoso (izquierda) al 20 % de *Tagetes multiflora* Kunth en *Pseudomonas aeruginosa* con estándar gentamicina



**Figura 23.** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico (derecha) y acuoso (izquierda) al 20 % de *Tagetes multiflora* Kunth en *Staphylococcus aureus* con estándar gentamicina.



**Figura 24.** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico (derecha) y acuoso (izquierda) al 20 % de *Tagetes multiflora* Kunth en *Bacillus subtilis*. Con estándar gentamicina.



**Figura 25.** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico (derecha) y acuoso (izquierda) al 20 % de *Tagetes multiflora* Kunth en *Aspergillus niger* con estándar fluconazol.



**Figura 26.** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico (derecha) y acuoso (izquierda) al 20 % de *Tagetes multiflora* Kunth en *Cándida albicans* con estándar fluconazol.

La tabla 13 muestra el análisis estadístico los diámetros de los halos de inhibición que se formaron en las cepas con el extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth a través de la prueba de ANOVA mediante el cual se demostró diferencia estadísticamente significativa entre muestras y no diferencia significativa intramuestra.

**Tabla 13.** Análisis estadístico entre e intramuestra a través de la prueba de ANOVA entre los resultados del extracto etanólico.

	GL	SC	CM	Relación F	
				Calculada	Tabular (p≤0,05)
Entre muestras	2	28,7	14,3	17,2	4,459
Intra muestras	5	2	1	1,2	4,459
Total	17	34			

En la tabla 14 muestra el análisis estadístico de los resultados de los halos de inhibición que se formaron en la cepa *Staphylococcus aureus* y el blanco etanol con el extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth a través de la prueba de ANOVA mediante el cual se demostró diferencia estadísticamente significativa entre muestras y no diferencia significativa intramuestra.

**Tabla 14.** Análisis estadístico entre e intramuestra a través de la prueba de ANOVA entre los resultados del extracto etanólico para la cepa *Staphylococcus aureus* y el blanco etanol

	GL	SC	CM	Relación F	
				Calculada	Tabular (p≤0,05)
Entre muestras	2	377,6	188,8	424,8	4,459
Intra muestras	5	0,9	0,4	1	4,459
Total	17	380,2			

#### 4.6. Evaluación de la actividad antioxidante: Método de captación del radical

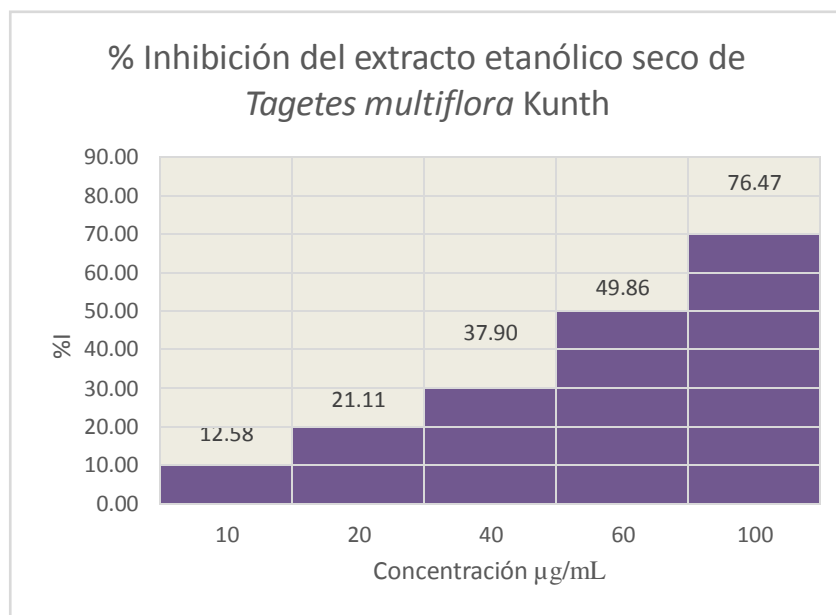
##### DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

###### a) Extracto etanólico seco de *Tagetes multiflora* Kunth “chinche”

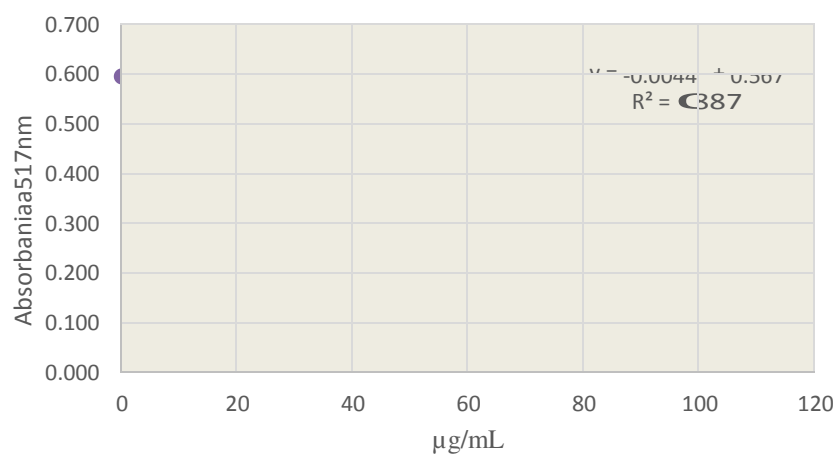
La tabla 15 y en las figuras 27 y 28, se pueden apreciar los resultados de las absorbancias y los porcentajes de inhibición para cada concentración del extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth. Los valores se muestran como el promedio  $\pm$  1 SD (n=3) y las letras diferentes en la columna de porcentajes de radicales libres indican que hay diferencias significativas entre ellas de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 15.** Resultados de la actividad antioxidante del extracto etanólico seco de *Tagetes multiflora* Kunth por el método de DPPH

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Extracto etanólico seco de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth	
	Promedio de absorbancias a 517nm	% Inhibición
10	0,519 + 0,004	12,58 + 0,696 (a)
20	0,469 + 0,004	21,11 + 0,677 (b)
40	0,376 + 0,002	37,90 + 0,401 (c)
60	0,306 + 0,003	49,86 + 0,423 (d)
100	0,158 + 0,003	76,47 + 0,422 (e)



**Figura 27.** Porcentajes de inhibición del extracto etanólico seco de *Tagetes multiflora* Kunth por el método del DPPH



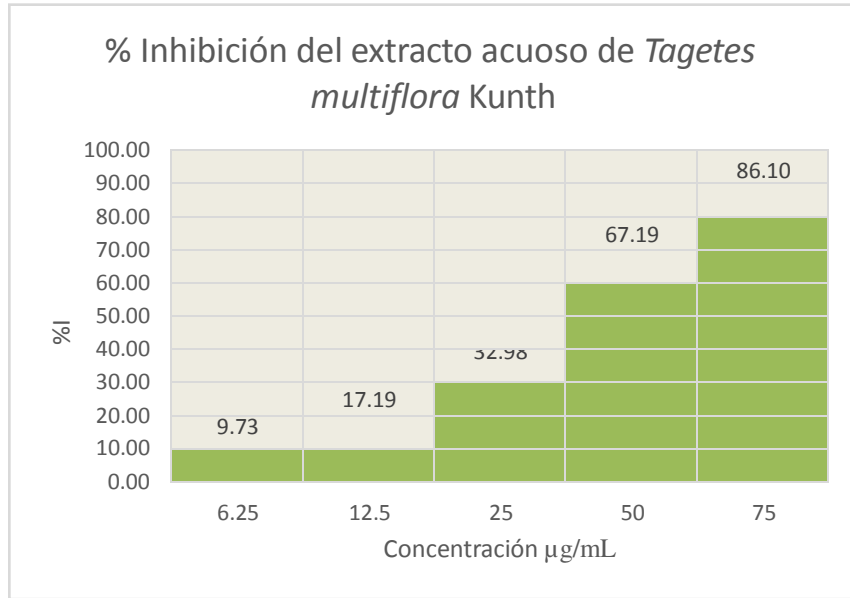
**Figura 28.** Absorbancia vs Concentración del extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth

**b) Extracto acuoso seco de *Tagetes multiflora* Kunth “chinche”**

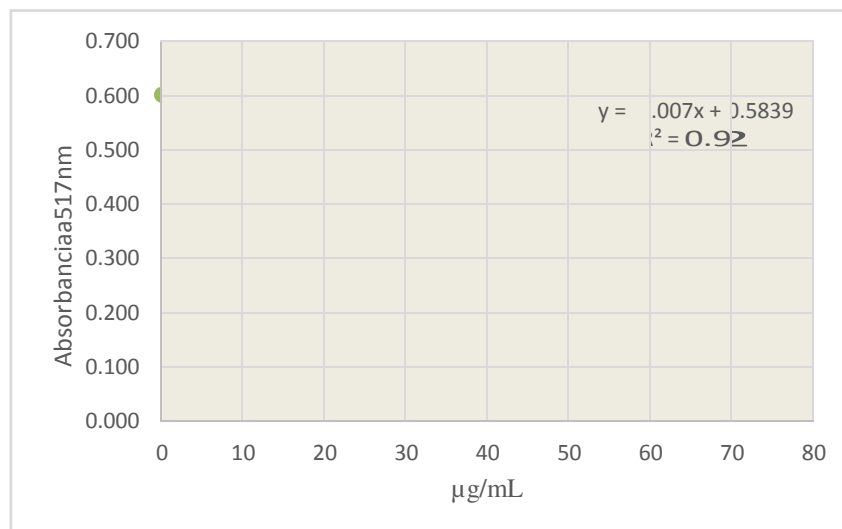
La tabla 16 y en las figuras 29 y 30, se pueden apreciar los resultados de las absorbancias y los porcentajes de inhibición para cada concentración del extracto acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth. Los valores se muestran como el promedio + desviación estándar (n=3) y las letras diferentes en la columna de porcentajes de radicales libres indican que hay diferencias significativas entre ellas de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 16.** Resultados de la actividad antioxidante del extracto acuoso seco de *Tagetes multiflora* Kunth por el método de DPPH

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Extracto acuoso seco de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth	
	Promedio de absorbancia a 517nm	% Inhibición
6.25	0,541 $\pm$ 0,004	9,73 $\pm$ 0,266 (a)
12.5	0,497 $\pm$ 0,001	17,19 $\pm$ 0,248 (b)
25	0,404 $\pm$ 0,002	32,98 $\pm$ 0,499 (c)
50	0,205 $\pm$ 0,001	67,19 $\pm$ 0,356 (d)
75	0,096 $\pm$ 0,002	86,10 $\pm$ 0,326 (e)



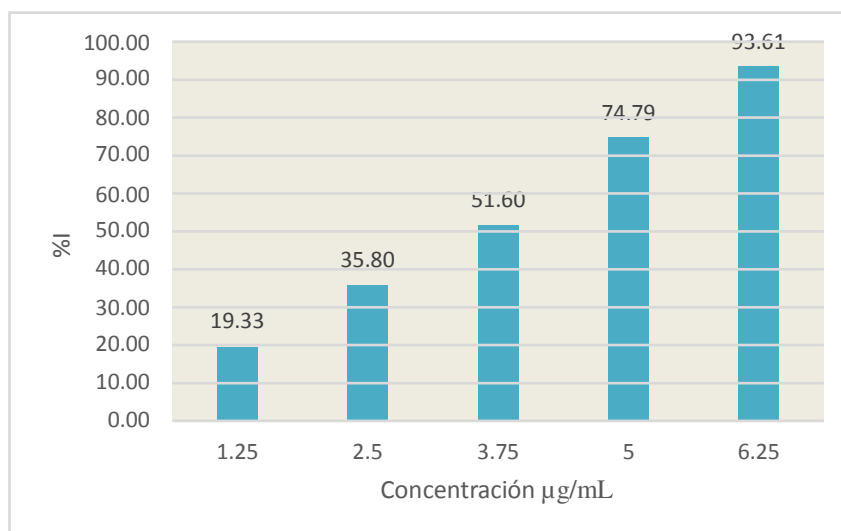
**Figura 29.** Porcentaje de inhibición del extracto acuoso seco de *Tagetes multiflora* Kunth por el método del DPPH.



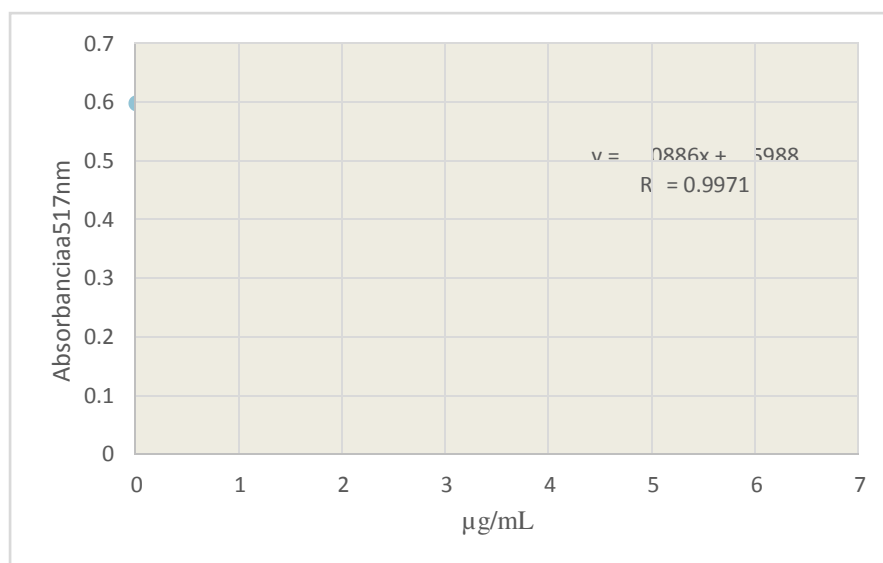
**Figura 30.** Absorbancia vs Concentración del extracto acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth

### c) Solución estándar Trolox

En la figura 31 y 32 se presentan los resultados del ensayo de la actividad antioxidante por DPPH para la solución patrón Trolox.



**Figura 31.** Porcentaje de inhibición del Trolox por el método del DPPH



**Figura 32.** Capacidad antioxidante de Trolox por el método de DPPH



Como se puede observar en la tabla 16, los valores del IC<sub>50</sub> y los µg equivalentes trolox de los dos extractos estudiados, muestra una mayor actividad antioxidante el extracto acuoso seco de *Tagetes multiflora* Kunth.

**Tabla 17.** Capacidad antioxidante del extracto etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth expresados en términos de IC<sub>50</sub> y TEAC

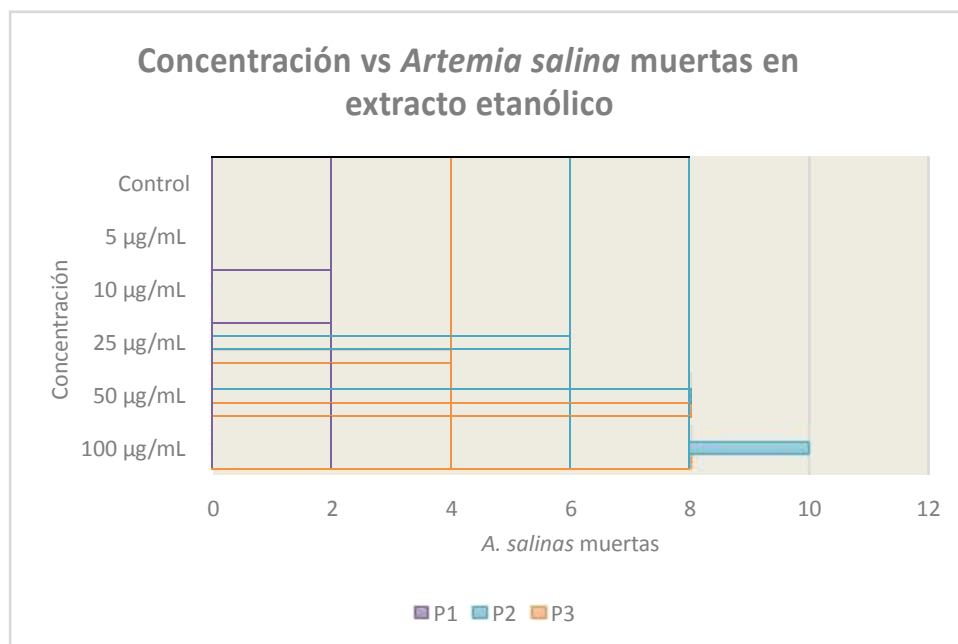
Muestra	IC <sub>50</sub> (ug/mL)	TEAC DPPH µg /mL
Extracto etanólico seco de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth	60,93 ± 0,40	55,94 ± 0,47
Extracto acuoso seco de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth	40,42 ± 0,24	83,53 ± 0,50
Trolox	3,395 ± 0,02	

#### 4.7. Evaluación de la actividad citotóxica: Bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina* (CYTED)

En la tabla 17 y figura 33 muestran el número de Artemias muertas para cada concentración de extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth. Como se puede observar a mayor concentración, mayor es número de muertes.

**Tabla 18.** Recuento de *Artemia salina* muertas en extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth a las 24 horas

	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL	Control
Extracto etanólico de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth	8	8	4	1	0	0
	10	8	6	3	0	0
	7	1	2	2	0	0



**Figura 33.** Gráfico comparativo de *Artemia salina* muertas en el extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth a las 24 horas.

Los resultados del bioensayo con *Artemia salina* a las 24 horas (Tabla18) fueron procesados con el Modelo PROBIT programa estadístico SPSS 22, cuya concentración letal media (CL<sub>50</sub>) resultó 35,568 µg/mL con una confiabilidad al 95% de 21,626 µg/mL y 66,325 µg/mL. Resultados que de acuerdo al CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) el extracto es tóxico.

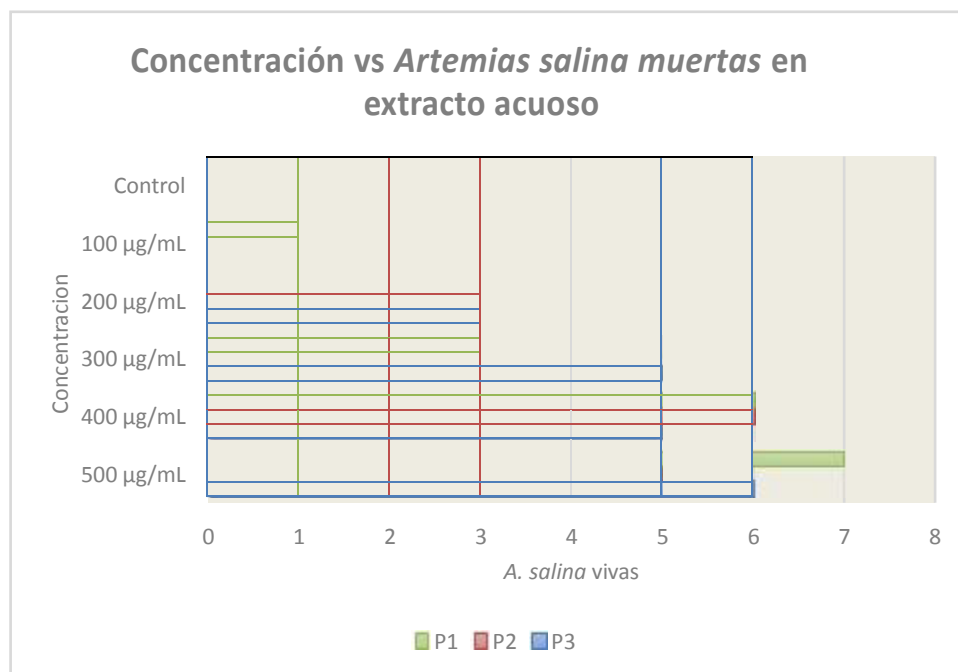
**Tabla 19.** Resultados del bioensayo de citotoxicidad del extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth procesados en el modelo Provit del SPSS 22.

	Log <sub>10</sub> (X)	N° Artemias			
5	0,7	10	0	3	35,568
10	1,0	10	2	20	
25	1,4	10	4	40	
50	1,7	10	6	60	
100	2,0	10	8	83	

En la tabla 19 y figura 34 muestran el número de Artemias muertas para cada concentración de extracto acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth. Como se puede observar a mayor concentración, mayor es número de muertes.

**Tabla 20.** Recuento de *Artemia salina* muertas en extracto acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth a las 24 horas

Extracto acuoso de <i>Tagetes multiflora</i> Kunth	500 µg/mL	400 µg/mL	300 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL	Control
	6	5	5	3	0	0
	5	6	2	3	0	0
	7	6	3	0	1	0



**Figura 34.** Gráfico comparativo de *Artemia salina* muertas en el extracto acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth a las 24 horas

Los resultados del bioensayo con *Artemia salina* a las 24 horas (Tabla 20) fueron procesados con el Modelo PROBIT programa estadístico SPSS 22, obteniéndose la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de 386,048 µg/mL con una confiabilidad al 95% de 296,327 µg/mL y 633,547 µg/mL. Resultados que de acuerdo al CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) el extracto es ligeramente tóxico.

**Tabla 21.** Resultados del bioensayo de citotoxicidad del extracto acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth procesados en el modelo Provit del SPSS 22.

	$\text{Log}_{10}(X)$				
<b>100</b>	2,0	10	0	3	386,048
<b>200</b>	2,3	10	2	20	
<b>300</b>	2,5	10	3	33	
<b>400</b>	2,6	10	6	57	
<b>500</b>	2,7	10	6	60	

## V. DISCUSIÓN

Los rendimientos de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth fueron 2,73 % y 1,50 % respectivamente (Tabla 8). No se encontraron literaturas en donde obtengan el rendimiento de extractos etanólicos en otras especies de *Tagetes*; sin embargo, se encontraron estudios de extractos con otros tipos de solventes como el de Téllez y col. (2013), quienes obtuvieron un rendimiento de 6,12 % de la extracción metanólica por maceración de las partes aéreas de *Tagetes lucida*<sup>66</sup>. Por otra parte Báez (2010) obtuvo los extractos de las hojas de *Tagetes lucida* utilizando solventes con diferentes polaridades, cuyos rendimientos fueron 2,38 % para el extracto en hexano, 3,43 % para el extracto en acetato de etilo, 6,98 % para el extracto en acetona y 1,18 % para el extracto metanólico<sup>68</sup>. La extracción etanólica de especies vegetales presentan ciertas ventajas, debido a que este solvente tiene la capacidad de extraer compuestos de una amplia gama de polaridades, además de ser menos costoso y tóxico que otros solventes orgánicos<sup>69</sup>. Es importante mencionar que las diferencias en los rendimientos pueden depender de diversos factores tales como el tiempo de maceración del vegetal, la temperatura a la que fueron concentrados los extractos y las condiciones ambientales en el momento de la recolección de la planta, factores que intervienen en la producción de metabolitos secundarios<sup>16, 67, 70</sup>.

La marcha de solubilidad del extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth demostró ser muy soluble en metanol y éter dietílico, y soluble en los demás solventes orgánicos (Tabla 9) y para el caso del extracto acuoso, este resultó ser muy soluble

únicamente en agua destilada (Tabla 10). Diaz (2014), en la prueba de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de *Tagetes elliptica* Sm, resultó que era muy soluble en éter etílico, soluble en etanol absoluto así como en n-hexano, poco soluble en etanol al 50% y en acetona y por último ligeramente soluble en acetato de etilo. Como se puede observar existen algunas coincidencias con los resultados del presente estudio ya que ambas especies pertenecen al mismo género<sup>13</sup>.

En la tabla 11 se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth donde se muestra alta variabilidad de compuestos presentes destacándose entre estos azúcares, taninos, aminoácidos libres, flavonoides, triterpenoides y esteroides, antocianinas y flavonoides catéquicos, glicósidos y azúcares reductores; evidenciándose solo la presencia de saponinas en el extracto etanólico. Estos resultados coinciden con lo reportado por Carrasco (2009) en su investigación fitoquímica de los extractos de la parte aérea de *Tagetes multiflora* Kunth donde demostró abundante presencia de fenoles-taninos en los extractos etanólico y acuoso, así como también abundante presencia de flavonoides en el extracto etanólico y moderada en el extracto acuoso <sup>10</sup>. Por otro lado, Solorzano (2014) en el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth presentó elevada presencia de flavonoides, taninos, quinonas, grasas y ácidos grasos; ligera presencia de antocianinas y azúcares reductores y poca presencia de colesterol y cumarinas <sup>16</sup>. Como podemos observar solo en algunos ensayos coinciden con los resultados del presente estudio y estas diferencias quizá puedan deberse a la diferencia altitudinales de las regiones, que pueden variar la composición de las plantas<sup>65</sup>.

En las pruebas cromatográficas se observó la presencia de ácido gálico en los extractos etanólico y acuoso, quercetina en el extracto etanólico y saponinas esteroidales en el extracto acuoso; mientras Solorzano (2014) en sus estudios cromatográficos en capa fina del extracto etanólico *Tagetes multiflora* Kunth (mezcla de hojas y flores) demostró la presencia de flavonoides del tipo isoramnetina glucósidos, rutina y ácido fenólicos<sup>16</sup>. Estas diferencias en los resultados serían debido a las características edafológicas y climatológicas donde se recolectó a las especies.

Respecto a la actividad antimicrobiana, las cepas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* resultaron sensibles al extracto etanólico y la cepa *Staphylococcus aureus* resultó muy sensible al extracto etanólico, según la escala de Duraffourd (Tabla 12). En el caso del extracto acuoso únicamente el *Aspergillus niger* fue sensible al extracto acuoso conforme a la escala de Duraffourd (Tabla 12). Carrasco (2009), en su estudio del aceite esencial de *Tagetes multiflora* Kunth frente a *Cándida albicans*, presentó actividad manifestándose con formación de halos en el aceite volátil, en las fracciones hidrocarbonadas y oxigenadas lo cual difiere al presente estudio <sup>10</sup>. Por su parte, Rea (2012) a través de su estudio de la actividad antimicrobiana por el método de Mitscher, comprobó que el extracto etanólico de *Tagetes filifolia* Lag presentó actividad parcial frente a *Candida albicans* ATCC 10231 a concentración de 10.000 µg/mL<sup>8</sup>. Díaz (2014) demostró que el extracto acuoso de *Tagetes elliptica* Sm. es inactivo en todas las cepas estudiadas y el extracto etanólico presentó actividad frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* en las concentraciones de 25, 50, 100 mg/mL, cuyos resultados presentan cierta



coincidencia con el presente estudio debido a que ambas especies vegetales pertenecen al mismo género <sup>13</sup>. La actividad antimicrobiana podría atribuirse a la presencia de polifenoles, flavonoides, taninos y triterpenoides que se pudieron evidenciar en el tamizaje fitoquímico en ambos extractos. A los principales tipos de flavonoides tales como las flavonas, flavanonas, chalconas y dihidrochalconas se les atribuye actividad antifúngica y antibacteriana <sup>57</sup>.

En la evaluación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth mediante el método de DPPH se reportaron un IC<sub>50</sub> de 60,93 ± 0,40 µg/mL y un TEAC 55,94 ± 0,47 µg equivalente de trolox/mL (Tabla 17). En el caso de extracto acuoso, reportaron un IC<sub>50</sub> de 40,42 ± 0,24 µg/mL y un TEAC de 83,53 ± 0,50 µg equivalente de trolox/mL (Tabla 17). Teniendo en cuenta que a menor valor de IC<sub>50</sub> es mayor la capacidad antioxidante <sup>59</sup>, el extracto acuoso presenta mayor capacidad antioxidante. La extracción de los compuestos antioxidantes, como los polifenoles, depende del tipo de disolvente, naturaleza y preparación del material a extraer, estructura química de los compuestos fenólicos, temperatura, tiempo de extracción, relación sólido-líquido, método de extracción empleado y posible presencia de sustancias interferentes <sup>62</sup>. Los resultados de este estudio parecen estar asociado al tipo de extracción en medio acuoso que favorecería la disolución y arrastre de los compuestos polifenólicos. Esto podría ser corroborado por el tamizaje fitoquímico donde resultó positivo a taninos, flavonoides, antocianinas y flavonoides catéquicos; así como en las cromatografías en capa fina que se observó presencia de ácido gálico y quercetina. Segovia y Suárez (2010) determinaron la actividad antioxidante del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith por el método de DPPH y obtuvieron un IC<sub>50</sub> de 975 µg/mL, valor que resultó mayor a la especie vegetal del

presente estudio <sup>11</sup>. Por otro lado, Karimian y col. (2014) demostraron que el aceite esencial de *Tagetes minuta* tuvo la capacidad de eliminar casi todas las especies reactivas de oxígeno/nitrógeno con un IC<sub>50</sub> 12-50 µg/mL, concluyendo que posee una potente actividad antioxidante <sup>12</sup>. También, Taheri et al. (2014) demostraron que el aceite esencial de *Tagetes minuta* presenta gran actividad antioxidante (ROS 12 µg/mL y RNS 17 µg/mL) <sup>15</sup>.

Según los estudios revisados, existen varias evidencias de especies vegetales del género *Tagetes* que presentan cierta actividad antioxidante <sup>11, 12, 15</sup>. En nuestro estudio se podría atribuir dicha actividad a la presencia de flavonoides (quercetina) y taninos que se encontraron en el tamizaje fitoquímico y en las cromatografías. Además, los flavonoides también destacan por su actividad antioxidante debido a la presencia de grupos hidroxilos del tipo fenólico en la mayoría de sus estructuras químicas<sup>57</sup>.

En el estudio de la actividad citotóxica del extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth por el método del bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina*, se obtuvo la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de 35,568 µg/mL (Tabla 19); resultados que de acuerdo a la escala del CYTED, el extracto etanólico es altamente tóxico <sup>52</sup>. Por otro lado, la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del extracto acuoso fue 386,048 µg/mL (Tabla 21), resultados que de acuerdo a la escala del CYTED el extracto acuoso es moderadamente tóxico <sup>52</sup>. En el estudio de Bussmann et al (2011) demostraron, mediante el bioensayo en *Artemia salina* que la concentración letal (CL<sub>50</sub>) de los extractos acuoso y etanólico de *Tagetes filifolia* Lag fueron 961 µg/mL y >10000 µg/mL, los cuales, según a la escala del CYTED no son tóxicos. Por otro lado, la

concentración letal (CL50) de los extractos acuoso y etanólico de *Tagetes erecta* L. fueron  $>10000 \mu\text{g/mL}$  y  $12 \mu\text{g/mL}$  respectivamente, de los cuales únicamente el extracto etanólico es tóxico <sup>6</sup>. En otro estudio, Mejía et al (2012) demostraron que la concentración letal media del extracto hexánico de hojas de *Tagetes lúcida* Cav. fue  $16 \mu\text{g/mL}$  en *Artemia salina* y concluyeron que la actividad tóxica se debe a las cumarinas <sup>7</sup>. Por lo tanto, estos resultados demostrarían que especies del género *Tagetes* poseen potencial actividad biológica <sup>58</sup>.

## VI. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron los extractos etanólico y acuoso a partir de las hojas y tallos de *Tagetes multiflora* Kunth con un rendimiento de 2,73 % y 1,50 % respectivamente. Además, en el tamizaje fitoquímico de los extractos etanólico y acuoso, se detectaron la presencia de azúcares, taninos, aminoácidos libres, flavonoides, triterpenoides y esteroides, antocianinas y flavonoides catéquicos, glicósidos y azúcares reductores; evidenciándose solo la presencia de saponinas en el extracto etanólico.
2. El extracto etanólico seco de *Tagetes multiflora* Kunth presentó actividad antimicrobiana frente a las cepas *Escherichia coli* (11,33 mm  $\pm$  0,58), *Pseudomonas aeruginosa* (13 mm  $\pm$  1,0) y *Staphylococcus aureus* (15,67 mm  $\pm$  1,15); y el extracto acuoso fresco presentó actividad antifúngica frente a la cepa *Aspergillus niger* (13,67 mm  $\pm$  0,58).
3. El extracto etanólico seco de *Tagetes multiflora* Kunth presentó actividad antioxidante *in vitro*, por el método DPPH con un IC<sub>50</sub> de 60,93  $\pm$  0.40  $\mu$ g/mL; y el extracto acuoso seco al 20% presentó actividad antioxidante con un IC<sub>50</sub> de 40,42  $\pm$  0,24  $\mu$ g/mL.
4. El extracto etanólico seco presentó alta actividad citotóxica con un CL<sub>50</sub> de 35,568  $\mu$ g/mL y el extracto acuoso seco al 20% presentó moderada actividad citotóxica con un CL<sub>50</sub> de 386,048  $\mu$ g/mL.

## VII. RECOMENDACIONES

- Ampliar el estudio de la capacidad antioxidante de *Tagetes multiflora* Kunth a través de otros métodos de evaluación de la actividad antioxidante, así como la determinación de sus principios bioactivos.
- Continuar el estudio microbiológico de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth y validar con otras metodologías.
- Profundizar el estudio citotóxico en los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth utilizando otros bioensayos, además de realizar un estudio de toxicidad *in vivo* y elaborar un plaguicida natural.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brako L, Zarucchi J. Catálogo de las plantas con flores y gimnospermas del Perú. Vol 45 USA: Monogr. Syst, Bot, Missouri Bot. Garden; 1993.
2. Jorgensen P, León-Yáñez S. Catálogo de las plantas vasculares del Ecuador. Vol 47 USA: Monogr. Syst, Bot, Missouri Bot. Garden; 1999.
3. Zuloaga F, Morrone O. Catálogo de las plantas vasculares de la República de Argentina I. Pteridophyta, gimnospermas y angiospermas (Monocotyledonae). Argentina: Monogr. Syst, Bot, Missouri Bot. Garden; 1999.
4. Cofre C. Determinación de la actividad insecticida y/o anti alimentaria del aceite esencial de Tzinsu *Tagetes minuta* en *Drosophila melanogaster*. [Tesis]. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2011.
5. Gong Y, Liu X, He W., Xu H, Yuan F, Gao Y. Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue. Elsevier. 2012; 83(3): 481-489.

6. Bussmann R, Malca G, Glenn A, Sharon D, Nilsen B, Dubose D, et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in northern Perú. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137(1): 121-140.
7. Mejía J, Del Río R, Martínez R, Flores A, Martínez M. Cytotoxic activity in *Tagetes lucida* Cav. *Emirates Journal of Food and Agriculture.* 2012; 24(2): 142-147.
8. Rea J. Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmico de (*Drymaria ovata*), (*Senna macrophylla*) y (*Tagetes filifolia* Lag). [Tesis]. Riobamba. Facultad de Ciencias; 2012.
9. Leung A, Foster S. *Encyclopedia of Common Natural Ingredients used in Food, Drugs and Cosmetics.* New Jersey: John Wiley & Sons; 2010.
10. Carrasco E. Estudio del aceite volátil y determinación *in vitro* de la actividad de *Tagetes multiflora* Kunth “chinche” frente a *Candida albicans*. [Tesis]. Lima. Escuela de Post Grado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.
11. Segovia I, Suárez L, Castro A, Suárez S, Ruiz J. Composición química del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith “chincho” y actividades antioxidante, antibacteriana y antifúngica. [Tesis]. Lima. Escuela de Post

Grado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.

12. Karimian P, Kavooosi G, Amirghofran Z. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Tagetes minuta* essential oil in activated macrophages. *Elvesier*. 2014; 4(3): 219-227.
13. Díaz J. Estructura química del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Tagetes elliptica* Sm. “chincho”, actividad antibacteriana y antifúngica en la aplicación de un alimento andino. [Tesis]. Lima. Escuela de Post grado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
14. Bussmann R, Malca G, Glenn A, Sharon D, Chait G, Díaz D, et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Perú as antibacterial remedies. *J Ethnopharmacol*. 2010; 132(1): 101-108.
15. Taheri M, Gholami H, Kavooosi G, Rowshan V, Tafsiry A. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils. *Food Science and Nutrition*. 2014; 2(2): 146-155.
16. Solorzano K. Identificación y cuantificación de flavonoides en los extractos etanólicos *Tagetes* sp, *Tagetes multiflora* y *Tagetes zipaquirensis* por



métodos cromatográficos. [Tesis]. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2014.

17. Tapia J. La familia Asteraceae. Yucatán Herbario CICY Centro de Investigación Científica de Yucatán [Revista en internet]. 2010 [citado el 24 de octubre del 2016]; 2: 82-84. Disponible en: [http://www.cicy.mx/SITIOS/desde\\_herbario/2010/diciembre/la-familia-asteraceae](http://www.cicy.mx/SITIOS/desde_herbario/2010/diciembre/la-familia-asteraceae)
18. Del Vitto L, Petenatti E. Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. Multequina. 2009; 18(87): 87-115.
19. Rocha M. Actividad antioxidante y efecto citotóxico de los extractos acetónicos de callo y lígula de *Tagetes lucida* y *Tagetes patula* sobre la línea celular Hela. [Tesis]. México D.F: Instituto Politécnico Nacional; 2013.
20. Aguirre R. Etnobotánica de Asteraceae. Vol 83. Boletín de la Sociedad Botánica de México. México: 2008.
21. Rojas S. Análisis de caracteres y descripción de los géneros más representativos de la subclase Asteridae (Magnoliopsida) presentes en Colombia. [Tesis]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2010.

22. Tereschuk M, Quarenghi M, González M, Baigori M. Actividad antimicrobiana de flavonoides aislados de *Tagetes* del Noa. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y Aromáticas 2007; 6(6), 364-366.
23. Farjana N., Rowshanul H., Zahangir A. y Rezaul K. *Tagetes erecta* Linn. And its mosquitocidal potency against *Culex quinquefasciatus*. Elsevier. 2011; 1(3): 186-188.
24. Loja B. Contribución al estudio florístico de la provincia de concepción, (Junín): Dicotiledóneas. [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002.
25. Pichette A, Garneau F, Collin G, Jean F, Gagnon H. Essential Oils from Bolivia. IV. Compositae: *Tagetes aff. maxima* Kuntze and *Tagetes multiflora* H.B.K. Journal of Essential Oil Research. 2005; 17(1): 27-28.
26. Heatley N. A method for the assay of penicillin, Biochemical Journal 1944; 38 (1): 61-65.
27. Jorgensen J, Ferraro M. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clinical Infectious Diseases. 2009; 49 (11): 1749–1755.

28. Caron F. Antimicrobial susceptibility testing: a four facets tool for the clinician. *Journ Des. Anti-Infectieux*. 2012; 14 (1): 186-174.
29. Nijs A, Cartuyvels R, Mewis A, Peeters V, Rummens L, Magerman K. Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41 (8): 3627–3630.
30. Kreger B, Craven D, McCabe W. Gram-negative bacteremia. IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *The American Journal of Medicine*. 1980; 68 (3): 344–355.
31. CLSI, Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi, Approved guideline, CLSI document M51A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2010.
32. Espinel-Ingroff A, Canton E, Fothergill A, Ghannoum M, Johnson E, Jones R, et al. Quality control guidelines for amphotericin B, itraconazole, posaconazole, and Voriconazole disk diffusion susceptibility tests with nonsupplemented Mueller–Hinton Agar (CLSI M51-A document) for nondermatophyte Filamentous Fungi. *Journal Clinical Microbiology*. 2011; 49 (7): 2568–2571.

33. Balouiri M, Sadiki M, Koraichi S. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016; 6(2): 71-79.
34. Magaldi S, Mata-Essayag S, Hartung de Capriles C, Perez C, Colella M, Olaizola C, et al. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal Infectious Diseases*. 2004; 8(1): 39–45.
35. Valgas C, De Souza S, Smânia E, Smânia A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007; 38(2): 369–380.
36. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radical in biology and medicine*. Oxford: Clarendon; 1989.
37. Halliwell B. *Reactive oxygen species in living systems: Sources, biochemistry and role in human disease*. Oxford: Clarendon; 1991.
38. Carhuapoma M. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán”. [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2006.
39. Camacho R. Evaluación de la actividad antioxidante e irritabilidad dérmica del aceite de Ungurahui *Oenocarpus batahua* para uso cosmético. [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.

40. Zamora J. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. Revista Chilena de Nutrición. 2007; 34 (1):17-26.
41. Mayor R. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. Revista Instituto de Medicina Tropical. 2010; 5(2): 23-29.
42. Tovar J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera. [Tesis]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2013.
43. Contreras J. Evaluación de la actividad antioxidante y el efecto citotóxico de los extractos etanólicos, etéreos y fracciones de las inflorescencias y hojas de *Achyrocline bogotensis* (Kunth) DC (*Asteraceae*). [Tesis]. Bogotá D.C: Universidad Distrital Francisco José de Caldas; 2015.
44. Aparcana I, Villareal L. Evaluación de la capacidad antioxidante d los extractos etanólicos del fruto de *Physalis peruviana* “aguaymanto” de diferentes lugares geográficos del Perú. [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
45. Vicente A, Manganaris G, Sozzi G, Crisosto C, Wojciech J, Robert L, et al. In Postharvest Handling. 2nd Edition. San Diego: Cornell University; 2009.

46. Ojha H, Mishra K, Chaudhury N. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food Chemistry. 2012; 130: 1036-1043.
47. Gatica-Colima A. Manual de prácticas: Morfología de invertebrados. Ciudad Juárez: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez; 2004.
48. Gamez C, Ramírez E. Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50-48</sub>) del herbicida Roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*. [Tesis]. Bogotá DC: Universidad de la Salle; 2008.
49. Sánchez L, Neira A. Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava* L y *Psidium guineense* Sw. Fundación Universitaria Juan de Castellano 2005; 40-45.
50. Durafflourd C, Hervicourt L, Lapraz J. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. 1º edición. París: Masson SA; 1983.
51. Ramos E, Castañeda B, Ibañez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. Rev Acad Perú Salud. 2008; 15(1): 42-46.

52. Pinzón R, Sánchez C. Manual de Técnicas de Investigación: CYTED. Subprograma X. Química fina farmacéutica 1995, 45-47.
53. Mason T, Wasserman B. Inactivation of red beet beta-glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry*. 1987; 26(8): 2197–2202.
54. Duke J. Handbook of medicinal herbs. 2da Ed. Boca ratón: CRC Press; 2002. Disponible en: <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Medicinal-HerbsSecondEdition/Duke/p/book/9780849312847#googlePreviewContainer>. [accesado el 09 de Agosto del 2017].
55. Cardenas C, Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de *Prosopis pallida* “algarrobo”. [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
56. Sato M, Fujiwara S, Tsuchiya H, Fujii T, Linuma M, Tosa H, et al. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *J Ethnopharmacol*. 1996; 54(2-3): 171–176.
57. Vásquez M. Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. In *Crescendo*. 2015; 6(1): 33-43.

58. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(4): 564-582.
59. Aguado M, Nuñez M, Bela A, Okulik N, Bregni C. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de un extracto etanólico de *Aloysia polystachya* (Griseb.) Mold. (Verbenaceae). Rev. Mex. Cienc. Farm. 2013; 44(3): 46-51.
60. Ordoñez A, Jaramillo L, Ibata M, Suárez-Obando F. Técnica de tinta China en células adherentes en cultivo. Nova. 2016; 13 (25): 07-16.
61. Hernandez R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. México DF: McGraw-Hill; 2010.
62. Bucic-Kojic A, Planinic M, Tomas S, Jokic S, Mujic I, Bilic M, et al. Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilized fig fruits (*Ficus Carica* L.). Pol. J. Food Nutr Sci. 2011; 61(3): 195-199.
63. Lock O. Investigación fitoquímica. 3 ed. Lima: Departamento de Ciencias – Pontificia Universidad Católica del Perú; 2016.
64. Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis. 2 ed. Berlin: Springer; 1996.



65. Hinojosa J, Gutiérrez M, Siller F, Rodríguez A, Morales A, Guerreiro P, et al. Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de las hojas de *Tithonia tubaeformis*. Rev. Cien. Biol. y Salud. 2012; 15(2): 53-60.
66. Téllez M, Treviño J, Verde M, Rivas C, Oranday A, Moran J, et al. Evaluación del efecto del extracto metanólico de *Tagetes lucida* sobre la función testicular y calidad espermática en ratas macho *Wistar*. Rev Mex Cienc Farm. 2013; 44(4): 43-52.
67. Garrido B, Polanco S, Gaitán I, Cáceres A, Paredes M. Caracteres farmacognósticos para el control de calidad de *Petiveria alliacea*, *Lippia graveolens* y *Tagetes lúcida*. Dominguezia. 2013; 29(2): 25-39.
68. Báez A. Evaluación de plantas medicinales con potencial en el control biológico del vector transmisor de dengue *Aedes aegypti*. [Tesis]. Tlaxcala: Instituto Politécnico Nacional; 2010.
69. Espitia J, Duran H, Fandiño J, Díaz F, Gómez H. Química y biología del extracto etanólico del epicarpio de *Crescentia cujete* L. (totumo). Rev Cub Plant Med. 2011; 16(4): 337-346.
70. Leite B, Edrada R, Batista F. Effect on the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. Scientific Report. 2016; 6:29265.

## IX. ANEXOS



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



*"Año de la Consolidación del Mar de Grau"*

### CONSTANCIA N°148 -USM-2016

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa) recibida de, **David Boris VELASQUEZ VILLAFUERTE**, estudiante de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Tagetes multiflora*** Kunth y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: ASTERIDAE**

**ORDEN: ASTERALES**

**FAMILIA: ASTERACEAE**

**GENERO: *Tagetes***

**ESPECIE: *Tagetes multiflora* Kunth**

Nombre vulgar: "chinche"

Determinado por Mag. Hamilton Beltrán Santiago.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 01 julio de 2016



  
**Dra. Haydee Montoya Terreros**  
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

DDB

## 1. Estabilización de la muestra



**Figura 35.** Muestra de *Tagetes multiflora* Kunth



**Figura 36.** Muestra vegetal secada en estufa



**Figura 37.** Muestra vegetal molida



**Figura 38.** Filtrado del extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth.

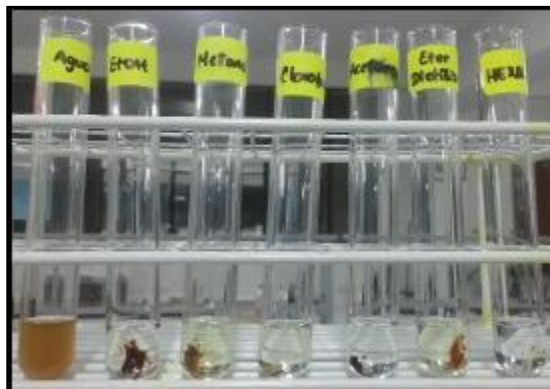


**Figura 39.** Extracto etanólico seco de *Tagetes multiflora* Kunth.

## 2. Tamizaje fitoquímico



**Figura 40.** Ensayo de solubilidad del extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth.



**Figura 41.** Ensayo de solubilidad del extracto acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth.



**Figura 42.** Ensayo de Molish.



**Figura 43.** Ensayo de antrona.



**Figura 44.** Ensayo de  $\text{FeCl}_3$ .



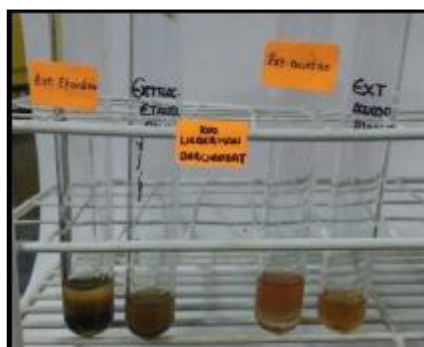
**Figura 45.** Ensayo de Gelatina.



**Figura 46.** Ensayo de Ninhidrina.



**Figura 47.** Ensayo de Shinoda.



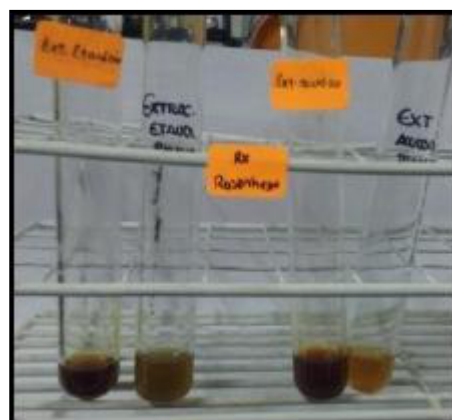
**Figura 48.** Ensayo de Lieberman - Burchardat.



**Figura 49.** Ensayo de Mayer.



**Figura 50.** Ensayo de Dragendorf.

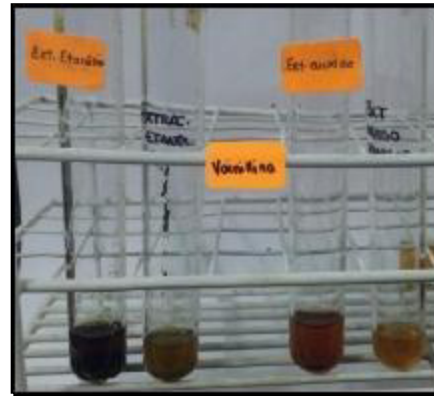


**Figura 51.** Ensayo de Rosenheim.





**Figura 52.** Ensayo de Hidroxilamina.



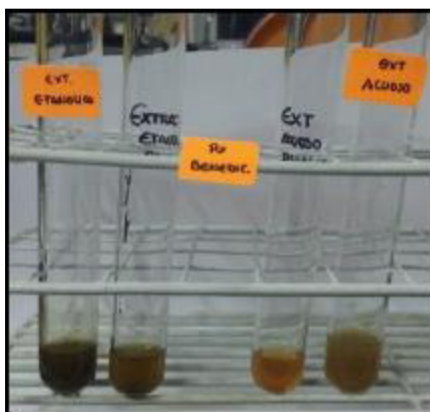
**Figura 53.** Ensayo de Vainillina.



**Figura 54.** Ensayo de Borntrager.



**Figura 55.** Ensayo de Fehling.



**Figura 56.** Ensayo de Benedict.



**Figura 57.** Ensayo de saponina.

### 3. Actividad Antioxidante



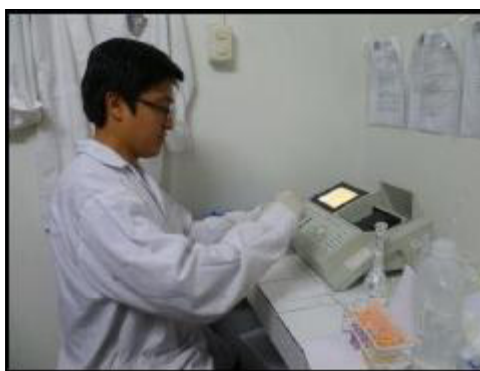
**Figura 58.** Preparación de diluciones de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth



**Figura 59.** Diluciones del extracto etanólico con solución de DPPH



**Figura 60.** Diluciones del extracto acuoso con solución de DPPH



**Figura 61.** Lectura de las muestras y blancos en el espectrofotómetro a 517 nm.

**Tabla 22.** Análisis estadístico ANOVA de los resultados de la actividad antioxidante del extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth

ANOVA					
% Inhibición					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	7619,621	4	1904,905	6530,209	,000
Dentro de grupos	2,917	10	,292		
Total	7622,538	14			

**Tabla 23.** Análisis estadístico de los resultados de la actividad antioxidante del extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth por el método de Tukey con un nivel de confianza al 95% ( $p \leq 0.05$ )

% Inhibición							
	Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
			1	2	3	4	5
<b>HSD</b> <b>Tukey<sup>a</sup></b>	10 ug/mL	3	12,5733				
	20 ug/mL	3		21,1100			
	40 ug/mL	3			37,9000		
	60 ug/mL	3				49,8600	
	100 ug/mL	3					76,4700
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<b>Tukey B<sup>a</sup></b>	10 ug/mL	3	12,5733				
	20 ug/mL	3		21,1100			
	40 ug/mL	3			37,9000		
	60 ug/mL	3				49,8600	
	100 ug/mL	3					76,4700
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.							
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.							

**Tabla 24.** Análisis estadístico ANOVA de los resultados de la actividad antioxidante del extracto acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth

ANOVA					
% Inhibición					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	12944,561	4	3236,140	26357,011	,000
Dentro de grupos	1,228	10	,123		
Total	12945,789	14			



**Tabla 25.** Análisis estadístico de los resultados de la actividad antioxidante del extracto acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth por el método de Tukey con un nivel de confianza al 95% ( $p \leq 0.05$ )

% Inhibición							
	Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
			1	2	3	4	5
<b>HSD</b> <b>Tukey<sup>a</sup></b>	6.25 ug/mL	3	9,7333				
	12.5 ug/mL	3		17,1850			
	25 ug/mL	3			32,9800		
	50 ug/mL	3				67,1843	
	75 ug/mL	3					86,0947
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<b>Tukey B<sup>a</sup></b>	6.25 ug/mL	3	9,7333				
	12.5 ug/mL	3		17,1850			
	25 ug/mL	3			32,9800		
	50 ug/mL	3				67,1843	
	75 ug/mL	3					86,0947
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.							
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.							

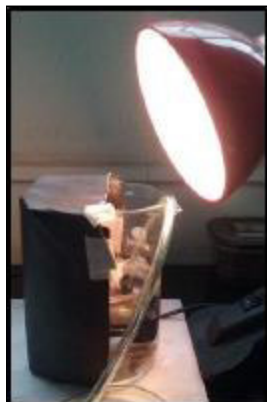
#### 4. Actividad citotóxica



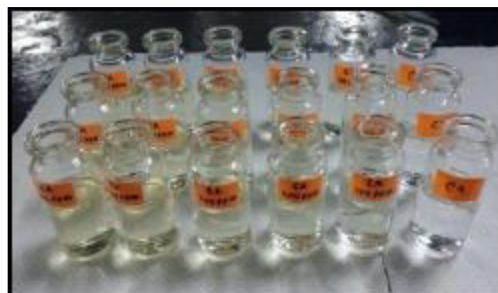
**Figura 62.** Preparación de la solución madre (2000 ppm) a partir de los extractos secos de *Tagetes multiflora* Kunth.



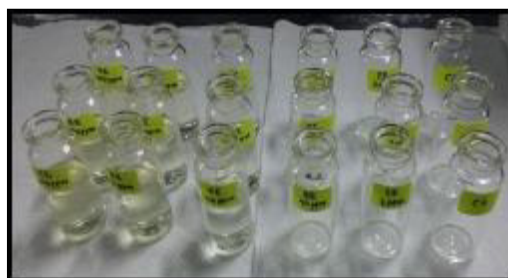
**Figura 63.** Preparación del agua de mar.



**Figura 64.** Incubación de los huevos de *Artemia salina* con luz artificial y con bomba de oxígeno con burbujeo lento.



**Figura 65.** Concentraciones de extracto acuoso y controles por triplicado.



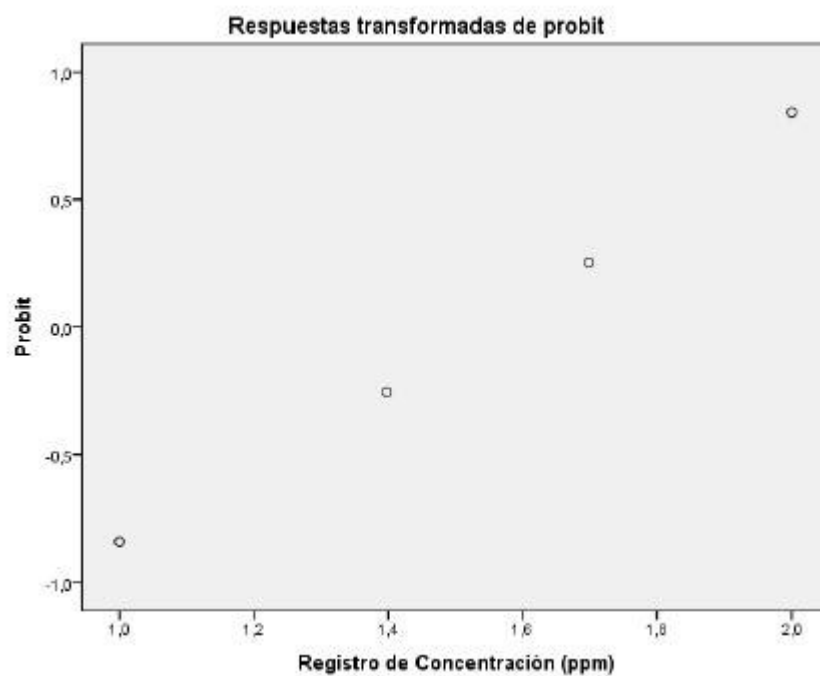
**Figura 66.** Concentraciones de extracto etanólico y controles por triplicado.

**Tabla 26.** Límites de confianza para el extracto etanólico de *Tagetes multiflora* Kunth

Límites de confianza							
	Probabilidad	95% de límites de confianza para Concentración (ppm)			95% de límites de confianza para registro(Concentración (ppm))a		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	,010	2,407	,160	6,125	,381	-,795	,787
	,020	3,300	,302	7,635	,518	-,520	,883
	,030	4,031	,451	8,795	,605	-,346	,944
	,040	4,686	,609	9,793	,671	-,216	,991
	,050	5,297	,776	10,698	,724	-,110	1,029
	,060	5,880	,954	11,542	,769	-,020	1,062
	,070	6,443	1,142	12,345	,809	,058	1,091
	,080	6,992	1,341	13,119	,845	,128	1,118
	,090	7,533	1,552	13,873	,877	,191	1,142
	,100	8,067	1,773	14,613	,907	,249	1,165
	,150	10,714	3,060	18,246	1,030	,486	1,261
	,200	13,425	4,668	22,016	1,128	,669	1,343
	,250	16,291	6,625	26,185	1,212	,821	1,418
	,300	19,382	8,946	31,028	1,287	,952	1,492
	,350	22,768	11,630	36,893	1,357	1,066	1,567
	,400	26,527	14,659	44,254	1,424	1,166	1,646
	,450	30,753	17,999	53,764	1,488	1,255	1,730
	,500	35,568	21,626	66,325	1,551	1,335	1,822
	,550	41,138	25,545	83,228	1,614	1,407	1,920
	,600	47,692	29,806	106,402	1,678	1,474	2,027
	,650	55,564	34,517	138,907	1,745	1,538	2,143
	,700	65,272	39,862	185,939	1,815	1,601	2,269
	,750	77,658	46,142	257,033	1,890	1,664	2,410
	,800	94,236	53,873	371,571	1,974	1,731	2,570
	,850	118,077	64,056	575,221	2,072	1,807	2,760
	,900	156,822	79,036	1004,559	2,195	1,898	3,002
	,910	167,948	83,072	1150,452	2,225	1,919	3,061
	,920	180,930	87,663	1333,498	2,258	1,943	3,125
	,930	196,367	92,970	1569,123	2,293	1,968	3,196
	,940	215,169	99,238	1882,572	2,333	1,997	3,275
	,950	238,820	106,856	2318,234	2,378	2,029	3,365
	,960	269,949	116,493	2962,150	2,431	2,066	3,472
	,970	313,832	129,451	4006,560	2,497	2,112	3,603

,980	383,404	148,790	5991,787	2,584	2,173	3,778
,990	525,672	184,971	11319,094	2,721	2,267	4,054

a. Base de logaritmo = 10.



**Tabla 27.** Límites de confianza para el extracto acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth

Probabilidad	95% de límites de confianza para Concentración (ppm)			95% de límites de confianza para registro(Concentración (ppm)) <sup>a</sup>		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT ,010	87,334	7,858	152,133	1,941	,895	2,182
,020	103,949	12,710	170,110	2,017	1,104	2,231
,030	116,093	17,228	182,771	2,065	1,236	2,262
,040	126,155	21,643	193,037	2,101	1,335	2,286
,050	134,980	26,043	201,915	2,130	1,416	2,305
,060	142,976	30,473	209,886	2,155	1,484	2,322
,070	150,375	34,958	217,222	2,177	1,544	2,337
,080	157,325	39,517	224,091	2,197	1,597	2,350
,090	163,924	44,162	230,611	2,215	1,645	2,363
,100	170,243	48,900	236,863	2,231	1,689	2,374
,150	199,103	74,210	265,908	2,299	1,870	2,425
,200	225,491	102,463	294,119	2,353	2,011	2,469
,250	250,900	133,622	324,323	2,400	2,126	2,511
,300	276,149	167,094	359,396	2,441	2,223	2,556
,350	301,809	201,605	403,014	2,480	2,305	2,605
,400	328,359	235,417	459,791	2,516	2,372	2,663
,450	356,267	267,118	534,844	2,552	2,427	2,728
,500	386,048	296,327	633,547	2,587	2,472	2,802
,550	418,318	323,603	762,355	2,622	2,510	2,882
,600	453,872	349,914	930,547	2,657	2,544	2,969
,650	493,799	376,312	1152,736	2,694	2,576	3,062
,700	539,682	403,895	1453,102	2,732	2,606	3,162
,750	593,993	433,960	1874,105	2,774	2,637	3,273
,800	660,926	468,343	2497,159	2,820	2,671	3,397
,850	748,521	510,201	3500,774	2,874	2,708	3,544
,900	875,414	566,381	5372,547	2,942	2,753	3,730
,910	909,159	580,626	5960,436	2,959	2,764	3,775
,920	947,293	596,426	6673,139	2,976	2,776	3,824
,930	991,074	614,206	7556,658	2,996	2,788	3,878
,940	1042,366	634,587	8683,792	3,018	2,802	3,939
,950	1104,112	658,536	10177,779	3,043	2,819	4,008
,960	1181,345	687,681	12267,274	3,072	2,837	4,089
,970	1283,736	725,082	15437,061	3,108	2,860	4,189
,980	1433,716	777,662	20961,601	3,156	2,891	4,321
,990	1706,463	867,760	33973,435	3,232	2,938	4,531

a. Base de logaritmo = 10.

